

Automatisierte Analyse konfokal endomikroskopischer Bilder zur Erkennung von Kopf-Hals-Tumoren

Automated analysis of confocal laser endomicroscopy images to detect head and neck cancer

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Andreas Peter Dittberner
geboren am 19.10.1980 in Burglengenfeld**

Gutachter

1.

2.

3.

Tag der öffentlichen Verteidigung:

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
Zusammenfassung.....	5
1. Einleitung	7
1.1 Optische Bildgebungsverfahren zur Erkennung von KHT	8
1.2 Konfokale Endomikroskopie	11
1.3 Automatisierte Bildverarbeitung in der Medizin	14
2. Ziele der Arbeit	16
3. Publierte Originalarbeit	17
4. Diskussion	25
4.1 CLE zur Erkennung von KHT	26
4.2 Automatisierte Bildanalyse	29
4.3 Limitierungen.....	30
4.4 Quo vadis automatisierter Bilderkennungsalgorithmus ?	32
5. Schlussfolgerungen	34
6. Literatur- und Quellenverzeichnis	35
7. Anhang	39
7.1 Ehrenwörtliche Erklärung	39
7.2 Lebenslauf	40
7.3 Danksagung.....	42

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
CLE	konfokale Endomikroskopie
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FAD	Flavin-Adenin-Dinucleotid
GFP	grün fluoreszierende Protein
HD	High Definition
HNO	Hals-, Nasen- und Ohren
i. v.	intravenös
KHT	Kopf-Halstumor
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mmol	Millimol
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
nm	Nanometer
NBI	Narrow-band imaging
OADT	oberer Aerodigestivtrakt
PACS	Picture Archiving and Communication System
PEC	Plattenepithelkarzinom
s	Sekunde
vs.	versus

Zusammenfassung

Den weltweiten Goldstandard zur Dignitätsbestimmung auffälliger Schleimhautläsionen des oberen Aerodigestivtraktes (OADT) stellt die invasive Entnahme von Gewebeproben zur Begutachtung durch einen Pathologen dar. Lässt sich histologisch ein maligner Tumor nachweisen, handelt es sich in über 90% der Fälle um ein Plattenepithelkarzinom (PEC) der Schleimhäute (Pai und Westra 2009). Die visuelle und endoskopische Untersuchung erfolgt aktuell sowohl ambulant als auch während Tumoroperationen im klinischen Alltag nur mit Weißlicht. Eine langjährige klinische Erfahrung und genaue Kenntnis der Anatomie sind daher zwingend notwendig, da eine frühzeitige Diagnose entscheidend für die Behandlungsstrategie und die Chancen auf Heilung der Patienten ist. Es handelt sich hier um eine stark untersucherabhängige Methode, die keine unmittelbare histologische Aussage zu Schleimhautveränderungen im OADT treffen kann (Ambrosch 1996). Deshalb werden seit Jahrzehnten weltweit verschiedene innovative optische Bildgebungsverfahren in der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde (HNO-Heilkunde) zur besseren Detektion und Abgrenzung von Tumoren entwickelt. Das ideale Ziel der einzelnen Verfahren ist non-invasiv und in Echtzeit im Sinne einer „optischen Biopsie“ während ambulanter Untersuchungen oder bei Operationen definitive Aussagen über Gewebeveränderungen zu treffen (Volgger et al. 2013a, Arens et al. 2016). Bisher wird noch kein optisches Diagnoseverfahren im klinischen Alltag angewendet (Betz et al. 2016). Eine relativ neue Technik stellt in diesem Zusammenhang die konfokale Endomikroskopie (CLE) dar. Im Vergleich zu anderen Fachdisziplinen wie beispielsweise der Gastroenterologie wurden in der HNO-Heilkunde nur wenige Arbeiten publiziert, die die CLE zur Erkennung von PEC verwendet (Abbaci et al. 2014, Goetz et al. 2011). Es wurde bisher gezeigt, dass diese optische Technik zu diesem Zweck ein gewisses Potential besitzt. Quantitativ messbare Kriterien, die eine eindeutige Unterscheidung zwischen Tumorgewebe und gesunder Schleimhaut ermöglichen, wurden aber noch nicht bestimmt (Thong et al. 2012, Volgger et al. 2013a). Unabhängig von einander kommen verschiedene Studien zu dem Schluss, dass bei der Betrachtung von CLE-Aufnahmen Unterschiede in der Architektur der Zellverbände und in der Zellgröße von Tumoren im Vergleich zu gesunder Schleimhaut auffallend sind (Pogorzelski et al. 2012, Haxel et al. 2010).

In der zugrunde liegenden publizierten Originalarbeit wird unseres Wissens der weltweit erste automatisierte Bilderkennungsalgorithmus zur Detektion von PEC im OADT anhand von CLE-Bilder vorgestellt. Die vorgelegte Arbeit ist zudem die weltweit erste Publikation, die quantitativ messbare Bilddaten in CLE-Bildern erhebt. Sie beweist, dass sowohl die Architektur der oberflächlichen Zellverbände als auch die Zellgröße in CLE-Bilder valide Kriterien sind, anhand derer ein PEC von gesunder Schleimhaut unterschieden werden kann. Darüber hinaus wurden bei der Studie indirekt zahlreiche Daten über die generelle Zellgröße und Gewebestruktur von PEC und gesunder Schleimhaut des OADT erhoben. Die prospektive Observationsstudie wurde in der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde am Universitätsklinikum Jena durchgeführt. Teilnehmer der Studie waren 12 Patienten mit klinischem Verdacht eines PEC. Die CLE-Bilder wurden nach intravenöser (i. v.) Applikation von Fluorescein in vivo während diagnostischer Panendoskopien aufgezeichnet. An allen untersuchten Schleimhautläsionen wurden direkt im Anschluss Biopsien entnommen. Zwei Gruppen mit einerseits histologischem Nachweis eines PEC (Tumorgruppe n=5) und andererseits mit gesunder Schleimhaut (Kontrollgruppe n=7) wurden gebildet. Die Auswertung der CLE-Aufnahmen sowie die Annotation relevanter Bildsequenzen und Bildareale erfolgte mit medizinischem Expertenwissen. Darauf aufbauend wurden im nächsten Schritt mit Methoden der digitalen Bilderkennung quantitativ messbare Bilddaten identifiziert. Die Analyse mit spezifischen Bilderkennungsverfahren („automated cell border segmentation, distance map“) ergab statistische Werte der Zellgrößen in den beiden Gruppen. Anhand dieser Informationen erfolgte das Training des Algorithmus mit der „leave-two-patients-out“-Methode (Hyperlink zum öffentlich zugänglichen technischen Report: <http://www.inf-cv.uni-jena.de/microscopyanalysis>). Unser Algorithmus ist in der Lage mit einer Spezifität von 0.85 ± 0.14 und einer Sensitivität von 0.72 ± 0.13 CLE-Bilder von PEC von gesunder Schleimhaut zu unterscheiden. Um die Aussagen des Algorithmus korrekt zu bewerten ist bei der Anwendung dieses optischen Verfahrens medizinisches Expertenwissen notwendig. Die Weiterentwicklung zur „online“-Anwendung im Sinne einer „optischen Biopsie“ als Ergänzung zur Weißlichtuntersuchung erscheint realistisch, wenn größere klinische Studien folgen.

1. Einleitung

Kopf-Halstumoren (KHT) sind weltweit eine der häufigsten Krebserkrankungen und sind mit einer hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrate gekennzeichnet. Trotz intensiver Bemühungen in der Entwicklung neuer Therapieansätze konnten diesbezüglich in den letzten 20 Jahren keine Verbesserungen erzielt werden. KHT werden daher weltweit auch in Zukunft ernsthafte Gesundheitsprobleme in der Gesellschaft verursachen (Rothenberg und Ellisen 2012).

Zwei Drittel aller KHT werden erst in den fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV mit bereits manifester Metastasierung in Halslymphknoten diagnostiziert. Die Chancen auf eine Heilung verringern sich für die Patienten dadurch deutlich (Haddad und Shin 2008). Trotz multimodaler Therapie mit Operation, Radiotherapie, Chemotherapie und/oder Immuntherapie treten in 50% der Fälle lokoregionäre Rezidive auf und 10-20% der Patienten entwickeln Fernmetastasen (Forastiere et al. 2001). International ist daher die Entwicklung von neuen innovativen wissenschaftlichen Ansätzen zur rechtzeitigen Erkennung von Tumorerkrankungen von großem Interesse.

Bei der Operation von KHT als kurative Therapiemaßnahme ist die Abgrenzung des Karzinoms vom umliegenden gesunden Gewebe von größter Bedeutung. Die komplette Tumorentfernung (R0-Resektion) ist dabei für die Prognose des Patienten entscheidend (Anderson et al. 2015). Intraoperativ soll dies durch die Entnahme von oftmals mehreren Schnellschnitt-Biopsien an den Resektionsrändern gewährleistet werden. Im Falle einer unkompletten Tumorentfernung (R1-Resektion) führt dies dann zu wiederholten Nachresektionen. Aktuell bestehen bei 7,5-10% der Fälle eine R1-Resektion, wovon 50% anschließend eine Re-Operation und/oder eine Radiotherapie benötigen. Bei den anderen 50% handelt es sich um unerkannte R1-Resektionen, von denen ca. 75% binnen 2 Jahren ein Rezidiv entwickeln (Weijers et al. 2004). Für den Operateur sind neben der Tumorentfernung mit der höchst möglichen Sicherheit gleichzeitig auch die Erhaltung der Funktionalität und damit die Schonung von möglichst viel gesundem Gewebe von Interesse. Die exakte Bestimmung von Tumorgrenzen ist aber aktuell intraoperativ noch nicht möglich. Die Entwicklung von neuen innovativen Techniken zur Verbesserung der Bestimmung von Tumorgrenzen ist daher international ebenfalls von großem Interesse (Betz et al. 2016).

1.1 Optische Bildgebungsverfahren zur Erkennung von KHT

Die weltweite Forschung an neuen, innovativen optischen Techniken in der HNO-Heilkunde dient dem höheren Ziel, ein Diagnoseverfahren für den klinischen Alltag zu entwickeln, welches unkompliziert als „optische Biopsie“ in Echtzeit und non-invasiv KHT erkennt. Idealerweise soll es darüberhinaus mit der größtmöglichen Sicherheit das Karzinom von gesundem Gewebe abgrenzen können. Die zahlreichen Verfahren, die in diesem Zusammenhang aktuell weltweit untersucht werden, besitzen entweder eine gute horizontale oder vertikale Gewebedarstellung. Eine höhere Eindringtiefe des jeweiligen Verfahrens bei der Gewebedarstellung bedeutet zeitgleich eine schlechtere optische Bildauflösung. Keines der aktuell beforschten Verfahren kann aber bisher im Kopf-Halsbereich in der klinischen Routine angewandt werden. Einerseits weil bisher eine ausreichende Spezifität und Sensitivität zum Nachweis oder Ausschluss eines KHT fehlt und andererseits weil bisher keine ausreichenden klinischen Studien durchgeführt wurden (Betz et al. 2016).

Bekannte optische Bildgebungsverfahren sind beispielsweise die Autofluoreszenzendoskopie und Autofluoreszenzspektroskopie. Die Anwendung von Autofluoreszenz zur Diagnostik von Krebserkrankungen wurde erstmals 1924 beschrieben (Burzynski et al. 1997). Natürlich vorkommende Fluorochromen wie beispielsweise Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NADH) und Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) sowie Kollagen und Elastin entwickeln im Wellenbereich zwischen 375 und 440 nm Autofluoreszenz im grünen Spektralbereich. Mit diesem Verfahren lässt sich ein vergleichsweise großer Bereiche wie etwa die gesamten Mundhöhle screenen. In dysplastischen Gewebeveränderungen nimmt hier die Fähigkeit zur Autofluoreszenz ab weshalb diese sich im Vergleich zur gesunden Schleimhaut dunkler darstellen (Lingen et al. 2008). Die Ergebnisse zahlreicher Studien, die die Vorteile dieses Verfahrens gegenüber der Betrachtung mit Weißlicht untersuchten, variieren stark. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich fortgeschrittene Schleimhautläsionen durch die geringere Autofluoreszenz kontrastreicher darstellen. Für die Erkennung von oberflächlichen Läsionen und frühen Tumorstadien wurde bisher mit diesem Verfahren aber kein Vorteil gesehen (De Veld et al. 2005). Die Autofluoreszenz des Gewebes kann durch die Autofluoreszenzspektroskopie gemessen und durch ein spezielles Kamerasystem abgebildet werden.

Die Erkennungsraten bösartiger Läsionen bei dieser Technik sind hoch, aber es ist nicht möglich bösartige Läsionen von gesunder Schleimhaut abzugrenzen und ein Scanning etwa der gesamten Mundhöhle bei einer Untersuchungsfläche von nur einigen Quadratzentimetern erscheint mit dieser Methode zu aufwändig. Bösartige Läsionen zeigen eine Fluoreszenz im orangen und roten Lichtspektrum, welche einer höheren Konzentration an Protoporphyrinen als Zeichen einer höheren Gefäßversorgung der Tumore zugeschrieben wird (Onizawa et al. 1996). Der Abbau von Kollagenfasern, welche die Hauptquelle für die Autofluoreszenz der Schleimhaut sind, soll in bösartigen Läsionen die Ursache für die Abnahme der Fluoreszenzintensität sein (de Veld et al. 2004). Diese Abnahme lässt sich auch durch Bestrahlung mit blauem Licht detektieren und Tumorgrenzen sollen dadurch besser bestimmt werden können (Poh et al. 2006). In Form eines Handgerätes mit dem Namen „VELscope“ (LED Medical Diagnostics Inc., Burnaby, Canada), welches in mehreren Studien getestet und von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen wurde, wird diese Technik vermarktet. Eine aktuelle Studie zeigte, dass auf die Art und Weise wie die Autofluoreszenz im „VELscope“ angewendet wird, Dysplasien und KHT nur mit einer sehr geringen Spezifität erkannt werden. Die Voraussetzungen für die korrekte Anwendung des „VELscope“ sind vorhandenes Expertenwissen über Anatomie und die zugrundeliegende optische Technik. Der negative prädiktive Wert des „VELscope“ hingegen ist hoch, weshalb eher die Aussage getroffen werden kann, dass eine Läsion nicht bösartig ist. Dies kann aber keinesfalls eine histologische Abklärung verdächtiger Läsionen ersetzen (Ganga et al. 2017).

In einer weiteren aktuellen Arbeit wurde die Intensität und Heterogenität der Autofluoreszenz von „VELscope“-Bildern von oralen Tumoren von 140 Patienten mit Techniken der digitalen Bildverarbeitung analysiert. Die Autoren erreichen mit ihrer Methodik eine hohe Spezifität von 0.923 und Sensitivität von 0.970, Karzinome und Präkanzerosen von gesunder Mundhöhlenschleimhaut abzugrenzen. Die Studie zeigt einen ausgezeichneten Ansatz bei der Kombination der Autofluoreszenz mit modernen, digitalen Bildverarbeitungstechniken und sollte unbedingt weiter verbessert werden (Huang et al. 2017).

Das „Narrow-Band-Imaging“ (NBI) der Firma Olympus (Shinjuku, Tokio, Japan) ist im Gegensatz zur Autofluoreszenzendoskopie ein relativ neuartiges bildgebendes Verfahren, welches schmalbandige Lichtfilter mit einem Peak-Absorptionsspektrum bei Hämoglobin mit zwei Wellenlängen (415 nm und 540 nm) einsetzt. Dadurch werden oberflächliche Kapillaren und Schleimhautschichten kontrastreicher dargestellt. Läsionen sollen durch Veränderungen im Farbton und unregelmäßigen Gefäßverläufen während endoskopischer Untersuchungen mit dieser Technik besser identifiziert werden können (Watanabe et al. 2008). Ein Vorteil ist, dass die Methode weder Kontrastmittel noch Epithelfärbungen erfordert. Beispielsweise bilden sich bei kanzerösen Veränderungen an den Stimmlippen vertikale Gefäßschleifen aus, die in gesundem Stimmlippenepithel nicht auffindbar sind (Arens et al. 2015). Die neue Gefäßarchitektur zeigt charakteristische Merkmale, die durch die übliche weißlichtbasierte Endoskopie nicht wiedergegeben werden können. Die Darstellung morphologischer Gefäßveränderungen der Schleimhaut mit NBI kann helfen, KHT zu diagnostizieren (Muto et al. 2004). In einer multizentrischen randomisierten Studie haben die Autoren durch gezieltes Screening von Risikogruppen oberflächliche Karzinome des OADT und des Ösophagus häufiger erkannt (Muto et al. 2010). Eine Inter- oder Intrarater Realibilität wird in der Studie nicht angegeben, sodass die Ergebnisse stark untersucherabhängig sind. Veränderungen der regulär angeordneten, intraepithelialen, papillären Gefäßschlingen der Kapillaren im Bereich der Stimmlippen wurden in einer Arbeit in fünf Kategorien eingeteilt, die jeweils gutartigen oder bösartigen Läsionen zugeordnet wurden (Ni et al. 2011). Für den klinischen Alltag würde sich daraus insofern dann ein Nutzen ergeben, wenn der Untersucher anhand dieser Kategorien intraoperativ in der Lage ist, ein besseres Operationsergebnis zu erzielen. Die Voraussetzungen für die korrekte Anwendung sind aber auch hier wieder vorhandenes Expertenwissen über die Anatomie und über die zugrunde liegende Technik. Das NBI wird aktuell erst vereinzelt in der klinischen Routine verwendet (Tirelli et al. 2016).

1.2 Konfokale Endomikroskopie

Marvin Minsky beschrieb 1957 als Erster das Prinzip der konfokalen Mikroskopie mit dem Ziel, die axiale und laterale Auflösung von Mikroskopen zu verbessern. Durch die Fokussierung des Lichtes und des Beobachtungssystems in einer Ebene soll die Information außerhalb dieses Fokus gelöscht werden (Minsky 1988).

Dieser Gedanke war die Basis für Weiterentwicklungen, die zur heutigen konfokalen Endomikroskopie führten. Zunächst wurden beispielsweise durch schnelles Scannen und die Anwendung einer rotierenden Nipkow Scheibe zweidimensionale Echt-Zeit-Bilder rekonstruiert (Petráň et al. 1968). Durch die erst später mögliche Verwendung einer wesentlich stärkeren Lichtquelle konnte dann das heute bekannte „konfokale Laser-Raster-Mikroskop“ entstehen (Sheppard und Shotton 1997).

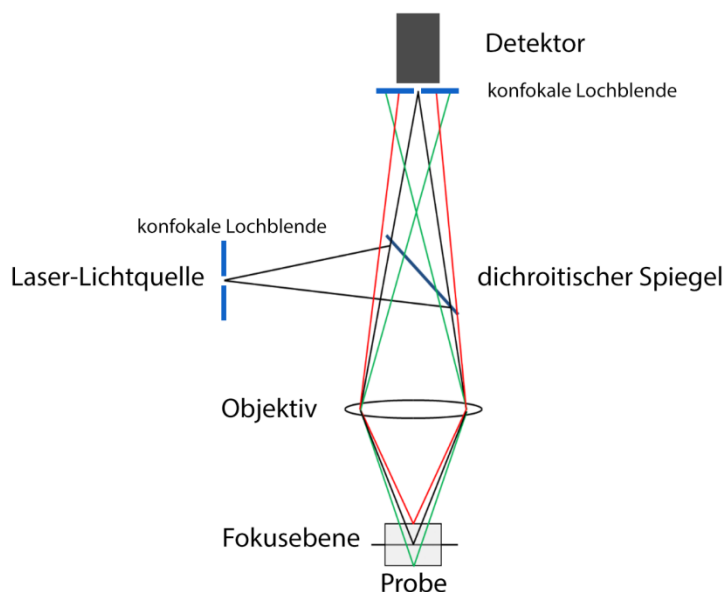


Abbildung 1: Schema der konfokalen Mikroskopie (Sheppard und Shotton 1997)

In der konventionellen Mikroskopie sind die Proben auf einem Objektträger sehr dünn und Bereiche oberhalb und unterhalb der Fokusebene sind unscharf, da diese „out of focus“ sind.

In der konfokalen Mikroskopie wird durch die Lochblende zwischen der Probe und dem Detektor nur die Information aus einer einzigen Fokusebene aufgezeichnet und erzeugt so einen scharfen optischen Schnitt „in focus“ durch die Probe. Damit können Oberflächen mit einer sehr hohen Vergrößerung und Auflösung aufgenommen werden. In einem konfokalen Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 1) wird die Probe in der Regel durch einen Laser beleuchtet. Das Licht einer Wellenlänge wird durch einen dichroitischen Spiegel reflektiert und fokussiert durch das Objektiv des Mikroskops einen definierten Punkt in der Probe. Diese spezifisch für die entsprechende Wellenlänge des dichroitischen Spiegels angeregte Region kann dann zum Beispiel in Kombination mit einem Fluorophor als reflektiertes Fluoreszenzlicht vom Detektor aufgenommen werden. Der Kontrast, der einerseits durch die Anregung der Fluorophore und andererseits durch die Absorption der übrigen Bildinformation entsteht, ist die Grundlagen für die Generierung der konfokalen Bilder. Das reflektierte Licht kommt am Detektor durch nacheinander gescannte Punkte in der x-y-z Ebene an und wird digitalisiert. Die Fluoreszenzmikroskopie bietet damit eine dreidimensionale (3D) optische Auflösung (Wang und Van Dam 2004).

Die in der Biologie angewendete konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie verwendet, im Hinblick auf das hohe Maß an Sensibilität bei der Untersuchung struktureller Komponenten und dynamischer Prozesse in lebenden Zellen und Geweben, häufig Fluoreszenz als Bildgebungsmodalität. Fluorophore werden daher als aromatische und organische Chemikalien synthetisiert, um mit einem biologischen Makromolekül wie etwa einem Protein oder einer Nukleinsäure zu binden, oder sich innerhalb einer bestimmten strukturellen Region wie beispielsweise dem Zytoskelett, Zellorganellen oder dem Zellkern anzureichern. Andere Fluorophore machen dynamische Prozesse und lokale Umgebungsvariablen wie etwa die Konzentrationen anorganischer metallischer Ionen, den pH-Wert und Membranpotentiale messbar. Fluoreszierende Farbstoffe können auch die zelluläre Integrität, Signaltransduktionen und enzymatische Aktivitäten sichtbar machen. Unersetzlich sind Fluorophore bei der genetischen Kartierung und Chromosomenanalyse im Bereich der molekularen Genetik.

Die Geschichte der synthetischen Fluorophore reicht bis in die späten 1800er Jahre, als viele der Grundfarbstoffe für die moderne Histologie entwickelt wurden.

Das in der Arbeit verwendete Fluorescein ist einer der beliebtesten jemals entworfenen Fluorochrome und kennzeichnet sich durch umfangreiche Erfahrungen in der Anwendung aus. Das Absorptionsmaximum bei 495 nm passt gut zu der vom Argon-Ion produzierten Spektrallinie bei 488 nm wie sie ein Argon- oder Krypton-Argon-Laser generiert. Darüber hinaus ist die quantitative Ausbeute der Fluoreszenzemission bei Fluorescein sehr hoch, wodurch eine beträchtliche Menge an Informationen über die physikalischen und chemischen Eigenschaften gesammelt werden konnten.

Fluoreszierende Proteine werden aus den unterschiedlichsten Quellen gewonnen und haben bekanntermaßen eine breite wissenschaftliche Anwendung. Aus der Qualle *Aequorea Victoria* wurde das Protein Aequorin extrahiert, welches zusammen mit einem zweiten isolierten Protein nach Anregung mit UV-Licht grün fluoresziert. Es wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) getauft (Shimomura et al. 1962). 1992 gelang es das GFP-Gen zu klonen (Prasher et al. 1992). Das Potenzial dieses Moleküls als molekulare fluoreszierende Sonde wurde 1994 erkannt (Chalfie et al. 1994). Gekoppelt an eine simultane GFP-Expression ließe sich nun jede andere Genexpression und kovalente Proteine in lebenden Organismen inhärent lokalisieren und überwachen.

Mit Hilfe von faseroptischen Fasern konnte ein konfokales Mikroskop an der Spitze einer Sonde in ein herkömmliches Endoskop integriert werden. Mit diesem Setup ist die Untersuchung beispielsweise von Darmpolypen sowohl mit Weißlicht als auch konfokalendomikroskopisch simultan auf zwei Monitoren möglich (Chauhan et al.). Dadurch wurde die Verwendung der konfokalen Endomikroskopie im Sinne einer „optischen Biopsie“ an bisher unzugänglichen Lokalisationen und somit auch im OADT realisiert.

1.3 Automatisierte Bildverarbeitung in der Medizin

Durch das Voranschreiten der Digitalisierung in der medizinischen Diagnostik gewinnt bei fast allen klinisch genutzten Bildmodalitäten (Röntgen, Computertomographie (CT), Magnetresonanztomographie (MRT), Ultraschall, Endoskopie und Mikroskopie) die digitale Bildverarbeitung zunehmend an Bedeutung. Neben den ohnehin bereits digitalen Verfahren MRT und CT werden nun auch analoge Verfahren wie zum Beispiel die Endoskopie durch digitale Sensoraufnahmen ersetzt. Diese digitalen Bilder bestehen aus einzelnen Bildpunkten, denen Helligkeits- oder Farbwerte zugeordnet sind. Sie können effizient aufbereitet, objektiv ausgewertet und über Kommunikationsnetze wie etwa das „Picture Archiving and Communication System“ (PACS) an vielen Orten gleichzeitig verfügbar gemacht werden. Damit eröffnet sich das gesamte Methodenspektrum der digitalen Bildverarbeitung für moderne medizinische Fragestellungen (Deserno 2011).

Der Begriff „Bildverarbeitung“ beschreibt die Aufbereitung von Bilddaten mit teilweise sehr komplexen und aufwändigen mathematischen Verfahren mit dem Zweck einer verbesserten Darstellung, Visualisierung und Interpretation durch den Arzt, ohne dass die eigentlichen Bildinhalte vom Bildverarbeitungssystem berücksichtigt werden müssen. Dagegen bezeichnet die „Bildanalyse“ diverse Ansätze, mit denen die in den Bilddaten enthaltenen und teilweise sichtbaren Informationen mit geeigneten Verfahren automatisch analysiert und detektiert werden, um diese dann in Folgeprozessen zu segmentieren, zu charakterisieren, und zu klassifizieren. Aus den so extrahierten Metadaten soll dann eine diagnostische oder interventionelle Handlungsempfehlung für den Arzt abgeleitet werden. Die Grenze zwischen diesen beiden Bereichen ist fließend und jeweils abhängig von der klinischen Fragestellung. In allen Fällen bleibt jegliche Entscheidung aber immer dem medizinischen Experten überlassen (Burger und Burge 2015).

Deep Learning ist auf dem Gebiet des maschinellen Lernens eine technologische Schlüsselinnovation. Die jüngsten Fortschritte brachten wesentliche Verbesserungen mit breiter Anwendung in Bereichen wie Bilderkennung, Spracherkennung, Verarbeitung natürlicher Sprache und künstliche Intelligenz. In einigen Fällen erwies sich die Methode sogar leistungsfähiger als der Mensch.

Dies ermöglichte die Einführung einer Reihe von Deep-Learning basierten Softwareprodukten und Automatisierungslösungen (Siri® von Apple®, Google Now®, Google Autonomous Driving®).

In der medizinischen Bildgebung gibt es bekanntermaßen weltweit ebenfalls umfangreichste Forschungsanstrengungen um die Möglichkeiten des Deep-Learning in moderne Behandlungs- und Diagnoseverfahren zu integrieren. Jedoch wird das Erfolgstempo des Fortschritts durch schlechtere Rahmenbedingungen wie beispielsweise einer geringeren Datenverfügbarkeit, dem Informations- und Qualitätsverlust durch „Störgeräusche“ in Bilddaten oder dem Fehlen einer standardisierten, multizentrischen Datenerfassung gebremst (Christlein et al. 2017). Die Anwendung von Deep-Learning in Kombination mit modernen optischen Bildgebungsverfahren soll in diesem Zusammenhang aktuell die von Chirurgen und Pathologen momentan verwendeten Diagnosemethoden keinesfalls ersetzen. Das Ziel ist vielmehr im Sinne einer „optischen Biopsie“ beispielsweise die Diagnose von KHT zu beschleunigen und die Bestimmung der Tumorgrenzen zu verbessern. Welche optischen Verfahren sich prinzipiell dafür eignen und welche spezifischen Stärken und Schwächen diese Verfahren mit sich bringen, konnte bisher aber nur in kleinen Studien in spezialisierten Zentren gezeigt werden. Aufgrund der fehlenden Evidenz wird daher von nahezu allen diesen Forschungsgruppen die Durchführung von großen, multizentrischen, kontrollierten und randomisierten Studien empfohlen (Betz et al. 2016). Die Beurteilung der jeweiligen Bildinformationen in den bisherigen Studien ist stark untersucherabhängig und beruht oft nur auf kurzen Trainingseinheiten mit Beispielbildern, anhand derer dann mit relativ großer Wahrscheinlichkeit eine neu untersuchte Läsion bösartig sein könnte (Oetter et al. 2016). Dieser Umstand würde sich durch die Anwendung von modernen Methoden der digitalen Bildverarbeitung verbessern lassen. Um dies zu ermöglichen, müssen aber für medizinische Experten und bei der technischen Ausstattung ausreichende Ressourcen und Rahmenbedingungen geschaffen werden. Sind diese Vorhanden führen für die beispielsweise Entwicklung einer im klinischen Alltag nutzbaren Software nur ein intensiver Austausch und eine enge Zusammenarbeit zwischen Medizinern, Informatikern und Medizinproduktentwicklern zum Erfolg.

2. Ziele der Arbeit

In der HNO-Heilkunde wird die CLE neben weiteren neuen und innovativen optischen Techniken mit der Hoffnung eingesetzt, KHT besser erkennen und abgrenzen zu können. Der Anteil an prognostisch ungünstigen R1-Resektionen und Lokalrezidiven mit dem aktuellen Standardverfahren, bestehend aus der Untersuchung mit Weißlicht und der histologischen Schnellschnittdiagnostik, ist mit 7-10% nicht zufriedenstellend. Innovative Bildgebungsverfahren sollen zukünftig als „optische Biopsie“ von einem Chirurgen bei Tumoroperationen als unterstützendes Hilfsmittel eingesetzt werden, um mit größerer Sicherheit eine vollständige Tumorresektion zu erreichen. Bisher zeigen In-vivo CLE-Untersuchungen von KHT und gesunder Schleimhaut allgemein vermutete, offensichtliche Unterscheidungsmerkmale wie etwa die Zellgröße oder die Architektur der oberflächlichen Zellverbände. Diese Kriterien sind aber stark von der subjektiven Wahrnehmung und Einschätzung des Untersuchers und seiner Erfahrung abhängig. Objektive Standards für CLE-Aufnahmen und Unterscheidungskriterien gibt es bisher nicht.

In der vorgelegten prospektiven Observationsstudie erfolgte im ersten Schritt die Auswertung der CLE-Aufnahmen der 12 in die Studie eingeschlossenen Patienten und die Definition und Annotation geeigneter Bildausschnitte. Anhand dieser Daten wurden in Zusammenarbeit mit den Kollegen des Lehrstuhles für digitale Bildverarbeitung an der Friedrich-Schiller-Universität Jena Unterscheidungskriterien erarbeitet. Dies geschah durch maschinelle Lernprozesse mit Methoden der digitalen Bildanalyse und Deep Learning in einem künstlichen neuronalen Netzwerk. Die automatische Segmentierung der Zellgrenzen und die Berechnung der Entfernung der Zellgrenze zum Zellmittelpunkt hat sich am Ende des Lernprozesses als sinnvollstes Verfahren zur Unterscheidung der CLE-Aufnahmen von Tumoren und gesunder Schleimhaut etabliert.

3. Publierte Originalarbeit

ORIGINAL ARTICLE

Automated analysis of confocal laser endomicroscopy images to detect head and neck cancer

Andreas Dittberner,^{1*} Erik Rodner, PhD,^{2*} Wolfgang Ortmann, PhD,² Joachim Stadler, MD,^{1*} Carsten Schmidt, MD,³ Iver Petersen, MD,⁴ Andreas Stallmach, MD,³ Joachim Denzler, PhD,² Orlando Guntinas-Lichius, MD^{1*}

¹Department of Otorhinolaryngology, Jena University Hospital, Jena, Germany, ²Department of Computer Science, Friedrich Schiller University, Jena, Germany, ³Division of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Department of Internal Medicine IV, Jena University Hospital, Jena, Germany, ⁴Institute of Pathology, Jena University Hospital, Jena, Germany.

Accepted 25 August 2015

Published online 00 Month 2015 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/hed.24253

ABSTRACT: *Background.* The purpose of this study was to develop an automated image analysis algorithm to discriminate between head and neck cancer and nonneoplastic epithelium in confocal laser endomicroscopy (CLE) images.

Methods. CLE was applied to image head and neck cancer epithelium in vivo. Histopathologic diagnosis from biopsies was used to classify the CLE images offline as cancer or noncancer tissue. The classified images were used to train automated software based on distance map histograms. The performance of the final algorithm was confirmed by "leave 2 patients out" cross-validation and area under the curve (AUC)/receiver operating characteristic (ROC) analysis.

Results. Ninety-two CLE videos and 92 biopsies were analyzed from 12 patients. One hundred two frames of classified neoplastic tissue and 52 frames of nonneoplastic tissue were used for cross-validation of the developed algorithm. AUC varied from 0.52 to 0.92.

Conclusion. The proposed software allows an objective classification of CLE images of head and neck cancer and adjacent nonneoplastic epithelium. © 2015 Wiley Periodicals, Inc. *Head Neck* 00: 000–000, 2015

KEY WORDS: head and neck cancer, diagnostics, confocal microscopy, segmentation, image analysis

INTRODUCTION

Head and neck cancer comprises a broad spectrum of diverse tumor types arising from various anatomic structures, including the craniofacial bones, soft tissues, salivary glands, skin, and mucosal membranes.¹ More than 90% are squamous cell carcinomas and form a heterogeneous group of cancer types on the molecular genetic level. Because of the most popular current model of tumorigenesis, the progression of head and neck cancer is a complex multistep process leading from squamous hyperplasia through graded dysplasia to invasive carcinoma.² Furthermore, the direct and indirect genotoxic effects of carcinogens in tobacco smoke and/or alcohol are the most important risk factors in most patients with head and neck cancer. They do not only lead to tissue alteration at the site of the tumor but affect large parts of the mucosa of the upper aerodigestive tract of the patient. Altogether, this often causes a continuum of a

primary head and neck squamous cancer, hyperplasia, dysplasia, and chronic inflammation without clear borders to normal surrounding mucosa. Furthermore, because of field cancerization, it might be that the patient, beyond the original invasive malignancy, is having multiple malignancies in various stages of development.³

White light examination, which is the standard of care for macroscopic evaluation of a suspected head and neck cancer, often does not allow a clear discrimination between the tumor and surrounding tissue. Biopsies and histopathology are needed to confirm malignancy and to define the tumor margins. This is time-consuming and operator dependent.⁴ Furthermore, accuracy depends on quality and quantity of the biopsies in a part of the body with limited space to allow large tumor margins.

To overcome such limitations, new optical methods based on real-time light-tissue interactions, like narrow-band imaging, autofluorescence imaging and confocal laser endomicroscopy (CLE) have recently been proposed.^{5,6}

Probe-based CLE combined with injection of contrast agents, such as fluorescein for staining, allows a high-contrast visualization of the surface epithelium and its extracellular matrix, as well as the structural and architectural comparison between surface mucosa and neoplastic tissue.⁷ CLE has already successfully found its way into routine clinical use in gastroenterology.^{8,9} Recently, it was also introduced for head and neck cancer diagnostics.^{10,11} General problems so far that hinder a clinical implementation is that optical

*Corresponding author: O. Guntinas-Lichius, Department of Otorhinolaryngology, Jena University Hospital, Lessingstrasse 2, D-07740 Jena, Germany. E-mail: orlando.guntinas@med.uni-jena.de

¹Present address: Department of Otorhinolaryngology, Head and Neck Surgery, University of Erlangen-Nuremberg, Erlangen, Germany

²Present address: Department of Otorhinolaryngology, Heinrich-Braun-Klinikum, Zwickau, Germany

Andreas Dittberner and Erik Rodner are joint first authors.



biopsies are far too complex to interpret and objective standards are missing.^{11,12} An optimal future solution would be a real-time automated image review independent of the surgeon and pathologist.

Therefore, the present study was set up to develop an automated image analysis algorithm, allowing, as a first step, a reliable discrimination of CLE still images of tumorous from nontumorous tissue in patients with head and neck cancer.

MATERIALS AND METHODS

Study design and setting

This prospective observational study was carried out at the Department of Otorhinolaryngology, Jena University Hospital, Germany. Approval for the study was obtained through the local institutional review board and informed consent was obtained from all study participants.

Patients and performance of the confocal laser endomicroscopy

The study cohort consisted of 12 patients with suspicion of head and neck cancer treated in 2012. Inclusion criteria were age ≥ 18 years, indication for diagnostic panendoscopy, and written informed consent. If histopathology confirmed head and neck cancer, the biopsy was assigned to the positive biopsies (tumor group). If histo-

pathology confirmed nontumorous or normal tissue, the biopsy was assigned to the negative biopsies (control group). Patients were not included if the CLE image set did not contain at least 4 different still images of a tumor (positive) or tumor-free (negative) areas. All patients fulfilled these criteria for at least for tumor or tumor-free areas (ie, all 12 patients were included). The images of those 12 patients were separated into the tumor group consisting of 5 of the patients, and the control group consisting of the remaining 7 patients.

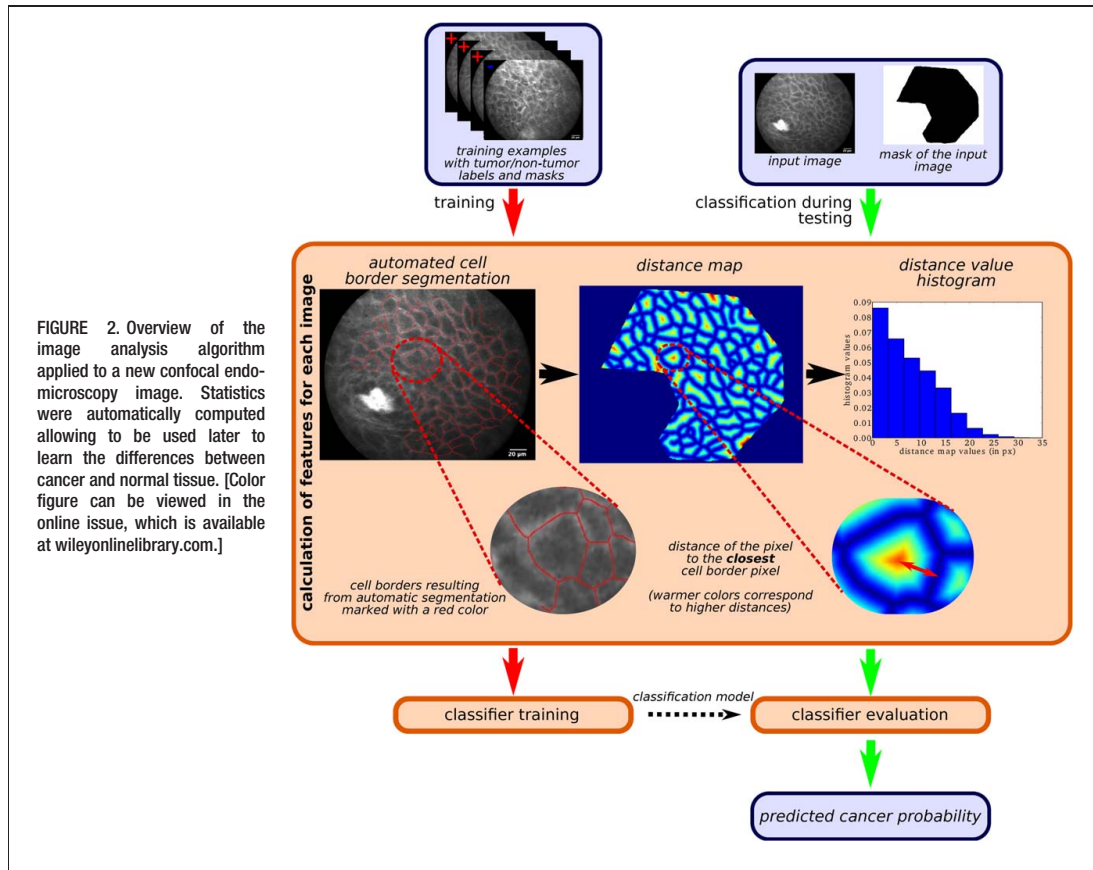
Standard panendoscopy was performed. The suspected tumor area was exposed. CLE was performed before taking the diagnostic biopsies (Figure 1). Confocal miniprobes (GastroFlex type ultra-high definition probe, lateral resolution: 1–3.5 μm ; depth of observation: 55–65 μm , field of view: 240 μm ; and magnification of $\times 1000$; Mauna Technologies, Paris, France) combined with a laser scanning unit (Cellvizio; laser wavelength: 488 nm; Mauna Technologies) were used. The flexible miniprobes are designed to pass through a working channel of a gastroscope. For optimal use during panendoscopy, the miniprobes were passed through a rigid metal Ferguson suction device (Karl Storz, Tuttlingen, Germany). Then a careful endoscopic evaluation of the suspected tumor area and its surrounding tissue was made. Fluorescein (5 mL of 10% solution; Alcon Pharma, Freiburg, Germany) was then administered intravenously. The confocal imaging was started directly after the application of the contrast agent. The procedure was video recorded (12 frames/second). Images were taken from the suspected lesion site and surrounding normal appearing mucosa. Finally, standard biopsies were taken from the same areas, preceding the standard histopathology.

Image analysis

Because confocal images of tumor areas and nontumor areas are hard to differentiate, nonstandard image analysis techniques had to be used and developed for this purpose. The main idea of the method we applied was to obtain and analyze statistics of epithelial cell sizes automatically from the image in 2 main algorithmic steps: (1) cell borders were estimated and histogram statistics were derived from a distance map¹³; (2) the histograms were analyzed automatically with machine learning techniques, learning from examples of images from both tumor and nontumor areas. Finally, our analysis technique returned a confidence score related to the predicted probability of whether a given confocal image was showing cancer tissue or not.

To determine cell borders, we used the following image processing pipeline. First, binarization was performed, based on local thresholds determined by the minimum and maximum intensity of a pixel neighborhood. Last, skeletonization of the resulting binary image was performed to obtain cell borders with 1-pixel width. In contrast to Süsse et al.,¹⁴ orientated filtering was not applicable because of the high noise level in the image, which resulted in an unstable estimation of local orientations.

A common method to obtain statistics for cell sizes is to perform region segmentation and connected component analysis. However, it was observed that this approach was not reliable enough for noisy confocal images. Therefore, a cell size statistics was obtained indirectly by computing

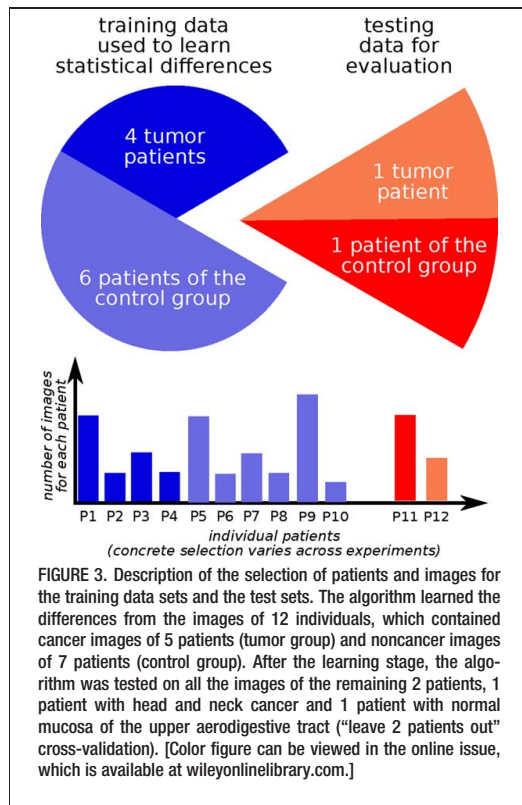


a histogram of a distance map applied to the binary image of cell borders. In this case, this yielded a histogram with 10 bins, which normalized and obtained invariance with respect to the scale of the confocal image. The histograms were then used as so-called feature vectors in a machine learning approach, which learned the differences between tumor and nontumor biopsy images and finally tried to automatically distinguish between these 2 categories. In particular, a nonlinear support vector machine with cross-validation was used to obtain optimal tradeoff parameters.¹⁵ Further algorithmic details can be found in a publicly available technical report (<http://www.inf-cv.uni-jena.de/microscopyanalysis.html>). An overview of the developed algorithm with intermediate results and statistics can be found in Figure 2.

Statistical analysis

The main questions that drove our evaluation and statistical analysis were: (1) can cancer areas and nontumor areas be differentiated using confocal images only; and (2) is our image analysis algorithm able to provide reliable confidence measures with a high degree of diagnostic accuracy. Because our image analysis algorithm has provided us with given images of cancer and nontumor

areas to learn the statistical differences, care had to be taken with their selection and their similarity with all images that the algorithm evaluated. Therefore, we used the following scheme, which is common for robustly evaluating machine learning algorithms.¹⁶ The algorithm learned the differences from the images of 12 individuals, which contained cancer images of 5 patients (tumor group) and nontumor images of 7 patients (control group). After the learning stage, the algorithm was tested on all the images of the remaining 2 patients; 1 patient with head and neck cancer and 1 patient with normal mucosa of the upper aerodigestive tract (Figure 3). This clear separation of the images the algorithm has learned from and images the algorithm was tested on was extremely important because we did not want to focus on differences between tumor and nontumor areas specific for single patients only (for an in-depth discussion see Ref. 17). The results depended on the selection of patients for training and testing and we were therefore performing multiple tests with all selections to provide mean values and SDs for the resulting diagnostic accuracy. The repeated testing with a random selection of images of 1 patient from the tumor group and 1 subject from the control group is also known as the “leave 1 sample out”



scheme, although, in our case, we always test with a positive and a negative example and therefore use the term “leave 2 patients out.”¹⁶

The diagnostic accuracy of the presented algorithm, the differentiation of neoplastic lesions, were from nonneoplastic biopsies in patients with newly diagnosed head and neck cancer was then evaluated by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis using histological diagnosis as reference. In addition, the area under the ROC curve (AUC) and its SD were determined as a measure of the diagnostic quality of the test. AUC values allowed the evaluation of the diagnostic accuracy of the algorithm without the need to define the tradeoff between sensitivity and specificity. A random algorithm would result in AUC values of 0.5 and a perfect algorithm achieves AUC values of 1.0. Furthermore, we also evaluated the performance of the algorithm when a concrete decision for tumor or nontumor had to be made instead of providing a classification score. In this case, a decision cutoff parameter had to be chosen to determine the classification score and define all examples as being tumor when a higher score than the threshold had been estimated. The decision cutoff was considered optimal when the product between sensitivity and specificity reached its maximum. Our sensitivity and specificity performance values were all estimated using this technique.

RESULTS

Patients

Eleven men and 1 woman were included. The mean age was 65.8 ± 11.1 years (range, 46.9–83.9). Histopathology confirmed head and neck squamous cell cancer in all 12 patients. The tumors were located in the cavity of the mouth ($n = 1$), oropharynx ($n = 5$), larynx ($n = 4$), hypopharynx ($n = 1$), and nasopharynx ($n = 1$). Ten of the 12 cases were classified as advanced stage (TNM stage III/IV). Overall, 92 CLE videos and 92 biopsies were analyzed. The mean number of biopsies from the tumor region per patient was 3 ± 1.4 (range, 1–5) and from noncancerous tissue it was 4.7 ± 2.6 (range, 1–8). The number of CLE videos of different areas per patient was 7.7 ± 2.2 (range, 4–11). The videos contained 937 ± 593.0 frames of cancer epithelium (range, 224–2584) and 1283 ± 635.5 frames of noncancer epithelium (range, 498–2708). One hundred two frames of neoplastic tissue and 52 frames of nonneoplastic tissue were selected for further analysis. Representative examples of CLE images of head and neck cancer epithelium and noncancerous epithelium in the neighborhood of the tumor are shown in Figure 4.

Learning process of the automated classification system and real-time feedback

The method developed was able to learn the differences between cancer epithelium and noncancer epithelium automatically. The input that a medical expert now had to provide for the learning phase was to label the regions of interest for analysis (ie, that the head and neck surgeon marked the tumor region on each selected frame and optionally to mask uninteresting areas). The latter allowed for ignoring artifacts and partial errors of the acquisition during the statistical analysis with machine learning methods. The learning process of the automated classification system was done within seconds on a standard computer and did not require specialized hardware. The final version of the software was able to analyze any new CLE images without prior labeling of regions of interest (ie, without further information provided by the head and neck surgeon).

After the learning process, our system was able to predict the probability of cancerous epithelium for a new frame within a few microseconds. Therefore, the real-time capability was achieved allowing for direct feedback during data acquisition. The predicted probability provided more information than a single label, because medical experts could also see when the automatic approach was uncertain about a decision and returned a probability close to 0.5.

Automated classification and statistical analysis

Finally, the training set consisted of 83 to 102 CLE images of head and neck cancer tissue and 25 to 53 CLE images of noncancerous epithelium. The results of multiple repetitions of the automated classification are shown in Table 1. For each of the 20 experiments, 1 individual from the tumor group and 1 individual from the control group were randomly selected for testing. When we consider all possible experiments (all pairs of positive and negative patients we used in our “leave 2 patients out” experiments for testing), we obtain an AUC value of 0.77 ± 0.11 (range,

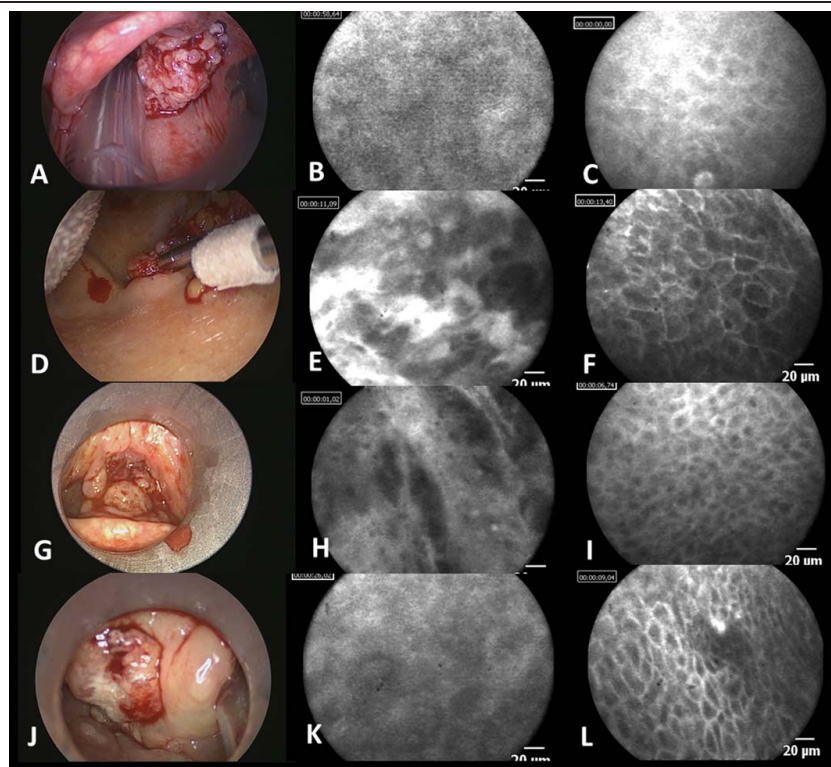


FIGURE 4. Examples of different head and neck cancer subsites. (A–C) Laryngeal cancer; (D–F) tonsillar cancer; (G–I) base of the tongue cancer; (J–L) hypopharyngeal cancer; (A/D/G/J) white light endoscopy image; (B/E/H/K) confocal endomicroscopy images of histologically confirmed squamous cell cancer; and (C/F/I/L) confocal endomicroscopy images of histologically confirmed normal tissue of the same patient. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

0.50–0.92). Furthermore, we obtained a mean accuracy of 0.74 ± 0.07 , specificity of 0.85 ± 0.14 , and sensitivity of 0.72 ± 0.13 (Figure 5).

DISCUSSION

Compared to gastroenterology and other disciplines, only a few studies have been published using CLE in head and neck cancer. Using 5-aminolevulinic acid-induced endogenous protoporphyrin IX fluorescence for CLE in 3 patients with tongue cancer and for the first time in head and neck cancer, Zheng et al¹⁸ observed increased cell size and density as descriptive criteria of tongue cancer compared to normal mucosa.¹⁹ Nuclear irregularity and spacing have been identified by other authors as qualitative criteria in 8 patients with oral cancer using reflectance CLE.²⁰ The 2 largest series (the first 13 and later 15 patients) on CLE with fluorescein staining (partly also with ex vivo topical acriflavine application) were published from the same group but also only presented descriptive data on CLE characteristics in head and neck cancer: irregular cell patterns, variability of cell size, cells with leaking of contrast agent into the surrounding tissue leading to a blurred impression, and higher density of capillaries in deeper layers.^{21,22}

Recently, unpublished data were reported in a review on CLE staining that using CLE with fluorescein labeling changes cellular sizes and also cellular shapes that were described to distinct dysplastic lesions and normal mucosa.¹⁰ None of the cited studies presented data on intra-observer or interobserver variability when classifying CLE images using these descriptive criteria. Therefore, the accuracy of these criteria to detect head and neck cancer is unknown. This present study is the first one to use quantitative measurable data of CLE images to distinguish head and neck cancer epithelium from normal mucosa.

Optical imaging is a complicated process that, so far, has had many challenges and limitations. The oncologic surgeon should know the fundamental principles of optical imaging to understand which conclusions can be drawn from the images.¹² Furthermore, the surgeon is normally not trained to interpret the histology-like images of tissues in vivo. Moreover, in contrast to the cross-sectional orientation of histological slides, CLE images are orientated parallel to the tissue surface. Theoretically, it is possible to reconstruct images in perpendicular orientation preferred by pathologists. Because of the physical properties of confocal microscopy, the axial resolution of

TABLE 1. Performance of the image analysis approach and classifier to discriminate between head and neck cancer tissue (positive) and nontumor tissue (negative) with random selection from the tumor and control groups.

No. of tests	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
No. of positive images for training	116	115	108	117	114	116	114	86	85	78	87	84	86	84	100	99	92	101	98	100
No. of negative images for training	57	55	37	56	56	51	58	50	48	30	49	49	44	51	55	53	35	54	54	49
No. of positive images for testing	2	3	10	1	4	2	4	32	33	40	31	34	32	34	18	19	26	17	20	18
No. of negative images for testing	2	4	22	3	3	8	1	9	11	29	10	10	15	8	4	6	24	5	5	10
AUC/ROC	0.75	0.92	0.69	0.67	0.50	0.94	0.75	0.88	0.79	0.83	0.88	0.82	0.76	0.77	0.88	0.75	0.72	0.81	0.77	0.72
Specificity	1.0	0.75	0.82	0.67	1.0	0.88	1.0	0.89	0.91	0.83	0.90	0.70	0.93	1.0	1.0	0.83	0.79	0.80	1.0	0.90
Sensitivity	0.50	1.0	0.60	1.0	0.25	1.0	0.75	0.78	0.67	0.83	0.77	0.88	0.59	0.65	0.67	0.68	0.69	0.76	0.55	0.50
Accuracy	0.75	0.86	0.75	0.75	0.57	0.90	0.80	0.80	0.73	0.83	0.80	0.84	0.70	0.71	0.73	0.72	0.74	0.77	0.64	0.64

Abbreviations: AUC/ROC, area under the curve/receiver operating characteristic.

Note: In each test, all images from 10 patients have been used for training and all images from 2 patients have been used for testing (1 patient from the tumor group and 1 patient from the control group).

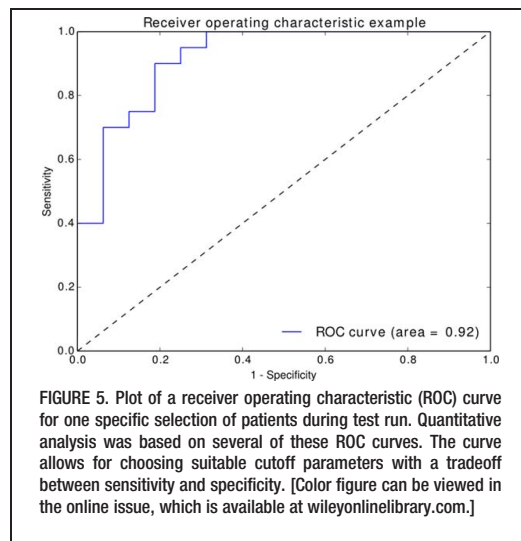


FIGURE 5. Plot of a receiver operating characteristic (ROC) curve for one specific selection of patients during test run. Quantitative analysis was based on several of these ROC curves. The curve allows for choosing suitable cutoff parameters with a tradeoff between sensitivity and specificity. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

the CLE images is less than the lateral resolution. Therefore, reconstructed in the perpendicular orientation it would look relatively blurry.²³ However, the pathologist is the predestined partner to interpret the images either called to the operating theater for frozen section analysis or via telemedicine. It has been shown recently that CLE can also expedite frozen histology for Mohs surgery of basal cell cancer.^{24,25} Using an optical imaging method, like CLE imaging, should not necessarily replace classic methods that the pathologist or the surgeon uses for head and neck cancer diagnostics, but should, at best, accelerate and improve the accuracy of cancer and tumor border diagnostics.

One important element for such an improvement might be automated image analysis. This present study shows that automated CLE image analysis is not only feasible but the presented first approach already shows a satisfactory mean accuracy of 74%, mean specificity of 85%, and mean sensitivity of 72% to discriminate head and neck cancer tissue from noncancerous tissue. The head and neck surgeon misdiagnosed 1 of the 12 cases of the present series (sensitivity: 91.6%). Similar results are reported for colorectal cancer. Using an automated software classification for CLE images to differentiate neoplastic colorectal lesions from nonneoplastic lesions, André et al²⁶ reported an accuracy of 89.6%, sensitivity of 92.5%, and specificity of 83.3%. The experienced endoscopist is a little bit better with values for sensitivity, specificity, and accuracy of about 97.1% to 98.6%, 96.9% to 99.0%, and 97.6% to 98.2%, respectively.²⁷ Concerning head and neck cancer, it is only possible to compare the present data to other optical imaging techniques. Classification of autofluorescence endoscopy images by an experienced head and neck surgeon has a better sensitivity, specificity, and accuracy than white light endoscopy of 91% versus 73%, 84% versus 79%, and 88% versus 77%, respectively.²⁸ For optical coherence tomography, a sensitivity and specificity of 77.8% to 100% and 70.3%

to 75.8%, respectively, is reported to differentiate an invasive from a noninvasive lesion in the upper aerodigestive tract.²⁹ Using high-resolution microendoscopy to image neoplastic versus nonneoplastic oral cancer, subjective image interpretation yielded sensitivity and specificity of 85% to 90% and 80% to 85%, respectively, whereas an objective classification algorithm achieved sensitivity and specificity of 81% and 77%, respectively. The average AUC/ROC for the subjective image interpretation was 0.92.³⁰ Summing up and comparing other optical image techniques, the presented technique is well on the way to become a tool for offline and online decision-making in patients with head and neck cancer.

The herein presented image analysis method has been specifically designed for detecting head and neck cancer, especially not for different subsites of head and neck cancer, and differs from previous methods in several aspects. The automated classification method of Duan et al¹⁶ to detect the presence of basal cell carcinoma is based on a set of statistical features derived from path segmentation and classification with a linear support vector machine. In contrast, the present method and distance map histograms are robust with respect to small errors of the cell segmentation. The presented machine learning methods allow for the handling of nonlinear dependencies in the data. Srinivasan et al³¹ used gradient orientation histograms for the automatic detection of diabetic macular edema in optical coherence tomography images. These histograms depend on the orientation of the images, and, in contrast to our distance map statistics, they are not suitable for the CLE images of our application because no rotational invariance is incorporated. Furthermore, our method goes beyond standard segmentation methods in medical image analysis^{32,33} and reconstruction approaches,³⁴ as well as feature analysis methods,³⁵ by providing task-specific and automated predictions of cancer probability. The method of André et al²⁶ is based on standard techniques from common image retrieval, such as bag-of-word features and k-nearest neighbors. In contrast, our distance map features indirectly captured rich statistical information about cell sizes and structure. In addition to this, our histograms can also be used for medical image retrieval, which would allow for an in-depth analysis of similar images by medical experts and would provide an indirect interpretation of the statistics used for our automated classification. In contrast to the method of Süssé et al,¹⁴ the presented approach does not make use of orientated filters, as the high degree of image noise in the CLE images, that we had in the presented scenario, does not allow for robust local orientation estimation. Furthermore, we make use of machine learning techniques to gather relevant statistics rather than predefining them from segmentation results.

The quantitative results of the presented automated algorithm figures that the cell size statistics contain important information to discriminate between cancer and noncancer epithelium. The presented results can therefore be seen as the first empirical proof of the claims of recent studies that epithelial cell sizes and cell characteristics change during tumorigenesis.^{18,19} Once again, our approach allows to directly quantify this change in a systematic manner, providing medical experts with a powerful diagnosis and indication tool.

It is important to address the current and intrinsic limitations of CLE, which is dependent on fluorescence dyes. As fluorescence CLE seems to be superior to reflectance CLE,²³ the intravenous application of the dye bears the theoretical risk of anaphylactic reactions, although the applications seem to be without major risks in clinical practice.³⁶ Additionally, the greatest anticipated progress of the method can be expected from molecular CLE (ie, to apply fluorescent probes specific to biomarkers, for instance by fluorophore conjugated and gold-nanoparticle conjugated monoclonal antibodies).^{37,38}

The CLE system we used had a fixed penetration depth. An advantage of this allowed a standardization of the imaging. A disadvantage is that it allowed only analysis of the superficial layer of the epithelium. It might be reasonably assumed that getting additional CLE information from deeper epithelial layers could improve the accuracy of the method. Similar to high-resolution microendoscopy, CLE has problems with keratinizing areas.^{12,39} Here, it would probably help to improve the CLE technique or make an improvement by combining CLE with other optical imaging techniques that have deeper resolution.^{34,40} It was necessary to select appropriate CLE images offline for the automated analysis. For application within the operating theater, the algorithm must be further developed to perform this selection fast and online. All these limitations make it clearer why we should not expect that the significant gap between optimal imaging and perfect optical biopsies will be easily bridged in the immediate future. In addition, probe-based CLE only allows imaging of very small spots. Scanning larger areas via automated mosaic building as well as incorporating dynamic information from the CLE videos could further improve the diagnostic accuracy of the method.^{41,42} The next steps for us will be the validation of the algorithm on a larger sample of patients with subsets of different localizations of head and neck cancer (ie, application in patients with early cancer and the specific examination of tumor margins).

CONCLUSIONS

CLE combined with automated classification seems to have the potential to add to white light evaluation in patients with head and neck cancer or during panendoscopy of patients with suspicion of head and neck cancer. The developed computer-based algorithm allows a reliable and objective offline analysis of CLE images. Further development of the algorithm also for use online seems to be mandatory to allow the establishment of CLE, which would be valuable in head and neck cancer diagnostics and as a surgery-guidance tool in clinical routine.

REFERENCES

1. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Ann Rev Pathol* 2009;4:49–70.
2. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11:9–22.
3. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963–968.
4. Hinni ML, Ferlito A, Brandwein-Gensler MS, et al. Surgical margins in head and neck cancer: a contemporary review. *Head Neck* 2013;35:1362–1370.

5. Hughes OR, Stone N, Kraft M, Arens C, Birchall MA. Optical and molecular techniques to identify tumor margins within the larynx. *Head Neck* 2010;32:1544–1553.
6. Keereweer S, Sterenborg HJ, Kerrebijn JD, Van Driel PB, Baatenburg de Jong RJ, Löwik CW. Image-guided surgery in head and neck cancer: current practice and future directions of optical imaging. *Head Neck* 2012;34:120–126.
7. Nathan CA, Kaskas NM, Ma X, et al. Confocal laser endomicroscopy in the detection of head and neck precancerous lesions. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2014;151:73–80.
8. Kiesslich R, Goetz M, Lammersdorf K, et al. Chromoscopy-guided endomicroscopy increases the diagnostic yield of intraepithelial neoplasia in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2007;132:874–882.
9. Leggett CL, Gorospe EC. Application of confocal laser endomicroscopy in the diagnosis and management of Barrett's esophagus. *Ann Gastroenterol* 2014;27:193–199.
10. Volgger V, Conderman C, Betz CS. Confocal laser endomicroscopy in head and neck cancer: steps forward? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;21:164–170.
11. Abbaci M, Breuskin I, Casiraghi O, et al. Confocal laser endomicroscopy for non-invasive head and neck cancer imaging: a comprehensive review. *Oral Oncol* 2014;50:711–716.
12. Keereweer S, Van Driel PB, Snoeks TJ, et al. Optical image-guided cancer surgery: challenges and limitations. *Clin Cancer Res* 2013;19:3745–3754.
13. Hesselink WH, Roerdink JB. Euclidean skeletons of digital image and volume data in linear time by the integer medial axis transform. *IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell* 2008;30:2204–2217.
14. Süssé H, Ortmann W, Lautenschläger C, Körner M, Schmidt C, Stallmach A. Oriented differences of boxes operators for blood vessel segmentation and analysis in confocal laser endomicroscopy images with minimal user interaction. In: Proceedings of the 17th Annual Conference in Medical Image Understanding and Analysis (MIUA); 2013. pp 155–160.
15. Schölkopf B, Mika S, Burges CC, et al. Input space versus feature space in kernel-based methods. *IEEE Trans Neural Netw* 1999;10:1000–1017.
16. Duan L, Marvdashti T, Lee A, Tang JY, Ellerbee AK. Automated identification of basal cell carcinoma by polarization-sensitive optical coherence tomography. *Biomed Opt Express* 2014;5:3717–3729.
17. Murphy KP. Machine learning, a probabilistic perspective. Cambridge, UK: MIT Press; 2012.
18. Zheng W, Harris M, Kho KW, et al. Confocal endomicroscopic imaging of normal and neoplastic human tongue tissue using ALA-induced-PPIX fluorescence: a preliminary study. *Oncol Rep* 2004;12:397–401.
19. Thong PS, Olivo M, Kho KW, et al. Laser confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity. *J Biomed Opt* 2007;12:014007.
20. Maitland KC, Gillenwater AM, Williams MD, El-Naggar AK, Descour MR, Richards-Kortum RR. In vivo imaging of oral neoplasia using a miniaturized fiber optic confocal reflectance microscope. *Oral Oncol* 2008;44:1059–1066.
21. Haxel BR, Goetz M, Kiesslich R, Gosepath J. Confocal endomicroscopy: a novel application for imaging of oral and oropharyngeal mucosa in human. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010;267:443–448.
22. Pogorzelski B, Hanenkamp U, Goetz M, Kiesslich R, Gosepath J. Systematic intraoperative application of confocal endomicroscopy for early detection and resection of squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2012;138:404–411.
23. Paull PE, Hyatt BJ, Wassef W, Fischer AH. Confocal laser endomicroscopy: a primer for pathologists. *Arch Pathol Lab Med* 2011;135:1343–1348.
24. Gareau DS, Patel YG, Li Y, et al. Confocal mosaicing microscopy in skin excisions: a demonstration of rapid surgical pathology. *J Microsc* 2009;233:149–159.
25. Chen CS, Sierra H, Cordova M, Rajadhyaksha M. Confocal microscopy-guided laser ablation for superficial and early nodular basal cell carcinoma: a promising surgical alternative for superficial skin cancers. *JAMA Dermatol* 2014;150:994–998.
26. André B, Vercauteren T, Buchner AM, Krishna M, Ayache N, Wallace MB. Software for automated classification of probe-based confocal laser endomicroscopy videos of colorectal polyps. *World J Gastroenterol* 2012;18:5560–5569.
27. Liu C, Li CQ, Zuo XL, et al. Confocal laser endomicroscopy for the diagnosis of colorectal cancer in vivo. *J Dig Dis* 2013;14:259–265.
28. Kraft M, Betz CS, Leunig A, Arens C. Value of fluorescence endoscopy for the early diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions. *Head Neck* 2011;33:941–948.
29. Volgger V, Stepp H, Ihrler S, et al. Evaluation of optical coherence tomography to discriminate lesions of the upper aerodigestive tract. *Head Neck* 2013;35:1558–1566.
30. Muldoon TJ, Roblyer D, Williams MD, Stepanek VM, Richards-Kortum R, Gillenwater AM. Noninvasive imaging of oral neoplasia with a high-resolution fiber-optic microendoscope. *Head Neck* 2012;34:305–312.
31. Srinivasan PP, Kim LA, Mettu PS, et al. Fully automated detection of diabetic macular edema and dry age-related macular degeneration from optical coherence tomography images. *Biomed Opt Express* 2014;5:3568–3577.
32. Danesh H, Kafieh R, Rabbani H, Hajizadeh F. Segmentation of choroidal boundary in enhanced depth imaging OCTs using a multiresolution texture based modeling in graph cuts. *Comput Math Methods Med* 2014;2014:479268.
33. Bredfeldt JS, Liu Y, Conklin MW, Keely PJ, Mackie TR, Eliceiri KW. Automated quantification of aligned collagen for human breast carcinoma prognosis. *J Pathol Inform* 2014;5:28.
34. Thong PS, Tandjung SS, Movania MM, et al. Toward real-time virtual biopsy of oral lesions using confocal laser endomicroscopy interfaced with embedded computing. *J Biomed Opt* 2012;17:056009.
35. Liu X, Shen M, Huang S, Leng L, Zhu D, Lu F. Repeatability and reproducibility of eight macular intra-retinal layer thicknesses determined by an automated segmentation algorithm using two SD-OCT instruments. *PLoS One* 2014;9:e87996.
36. Wallace MB, Meining A, Canto MI, et al. The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 2010;31:548–552.
37. Pierce MC, Javier DJ, Richards-Kortum R. Optical contrast agents and imaging systems for detection and diagnosis of cancer. *Int J Cancer* 2008;123:1979–1990.
38. Karstensen JG, Klausen PH, Saftoiu A, Vilmann P. Molecular confocal laser endomicroscopy: a novel technique for in vivo cellular characterization of gastrointestinal lesions. *World J Gastroenterol* 2014;20:7794–7800.
39. Vila PM, Park CW, Pierce MC, et al. Discrimination of benign and neoplastic mucosa with a high-resolution microendoscope (HRME) in head and neck cancer. *Ann Surg Oncol* 2012;19:3534–3539.
40. Olsovsky C, Shelton R, Carrasco-Zevallos O, Applegate BE, Maitland KC. Chromatic confocal microscopy for multi-depth imaging of epithelial tissue. *Biomed Opt Express* 2013;4:732–740.
41. Rosa B, Erden MS, Vercauteren T, Herman B, Szewczyk J, Morel G. Building large mosaics of confocal endomicroscopic images using visual servoing. *IEEE Trans Biomed Eng* 2013;60:1041–1049.
42. Wani S, Shah RJ. Probe-based confocal laser endomicroscopy for the diagnosis of indeterminate biliary strictures. *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29:319–323.

4. Diskussion

KHT sind weltweit eine der häufigsten Krebserkrankungen. Sie sind gekennzeichnet durch hohe Morbiditäts- und Mortalitätsraten, die trotz intensiver Bemühungen bei der Entwicklung von neuen Therapieansätzen, in den letzten 20 Jahren nicht verbessert werden konnten. Deshalb werden KHT auch in Zukunft ernsthafte Gesundheitsprobleme in der Bevölkerung verursachen (Rothenberg und Ellisen 2012).

Zwei Drittel aller KHT werden erst in den fortgeschrittenen Tumorstadien III und IV mit bereits manifesten Halslymphknoten-Metastasen diagnostiziert. Dadurch verringern sich Chancen auf Heilung für die Patienten deutlich (Haddad und Shin 2008). Entsprechend der allgemein akzeptierten Vorstellung der Tumorgenese ist die Entstehung und das Voranschreiten ein komplexer Prozess mit stufenweisem Verlauf. Er beginnt zunächst bei der einfachen Epithelhyperplasie aus der eine Epitheldysplasie und dann ein invasives Karzinom entsteht. Die hauptsächlichen Risikofaktoren Zigarettenrauch und/oder Alkohol führen dabei aber nicht nur an der Lokalisation des Tumors zu einer Gewebsalteration. Sie verändern vielmehr große Teile der Schleimhaut des gesamten oberen Aerodigestivtrakts (Leemans et al. 2011). Der Patient kann aufgrund dieser sogenannten Feldkanzerogenisierung neben dem Index tumor noch weitere maligne Tumoren in verschiedenen Stadien der Entwicklung entwickeln (Slaughter et al. 1953).

Besteht ein kurativer Therapieansatz, wird die Mehrzahl der Fälle mit einer multimodalen Therapie (Operation, Radiotherapie, Chemotherapie und/oder targeted therapy) behandelt. Etwa 50% der Patienten entwickeln aber trotzdem ein lokoregionäres Rezidiv und 10-20% der Patienten entwickeln darüberhinaus Fernmetastasen (Forastiere et al. 2001). Weltweit ist man sich einig, dass ein erhebliches diagnostisches Defizit bei der Frühdiagnostik von Präkanzerosen und minimalinvasiven Tumoren des OADT herrscht. Zum einen liegt die Sensitivität der visuellen Untersuchung mit Weißlicht bei der Erkennung von KHT bei 67,4%, zum anderen bestehen derzeit keine Hinweise, dass Screening-Programme zur Krebsvorsorge und Früherkennung für die Gesamtbevölkerung in irgendeiner Weise effektiv sind (Brocklehurst et al. 2013). Es ist daher dringend notwendig diese seit Jahrzehnten konstanten Defizite in der Diagnostik und Behandlung von KHT zu verbessern.

4.1 CLE zur Erkennung von KHT

An einzelnen Zentren wurde in bisher nur kleinen Studien gezeigt, dass innovative optische Diagnoseverfahren das Potenzial haben, die Frühdiagnostik von KHT zu revolutionieren. Die der Dissertation zugrunde liegende Publikation ist eine der wenigen Arbeiten, die sich in diesem Zusammenhang mit CLE beschäftigt. In anderen Fachbereichen wie etwa der Gastroenterologie wurde bisher eine weitaus größere Anzahl an Studien mit CLE durchgeführt. Sie wird bereits vereinzelt als diagnostisches Hilfsmittel zur Beurteilung des Barrett-Ösophagus und von Kolonpolypen in Kliniken angewendet (Volgger et al. 2013a). Wenn durch eine Methode Bilddaten erzeugt werden, mit deren Bildinformationen Untersucher zukünftig bei ihren Entscheidungen unterstützt werden sollen, müssen diese Bildinformationen zunächst grundsätzlich definiert werden. Bei der Untersuchung von KHT mit CLE wurden in diesem Zusammenhang bisher keinerlei Standards erarbeitet oder festgelegt. Die erste Studie, die die CLE überhaupt mit der Fragestellung der Erkennung von KHT verwendete, wurde ex-vivo an 3 Patienten mit Zungenkarzinomen durchgeführt. Der Autor beschreibt dabei als vordringlichste Bildinformationen eine höhere Zelldichte in der Architektur der Zellverbände bei Zungenkarzinomen und identifiziert dies als auffälliges Unterscheidungskriterium gegenüber gesunder Schleimhaut (Zheng et al. 2004). Eine weitere Studie beschreibt eine straßenpflasterartige Anordnung der Zellen und dickere Zellwände als typisches Merkmal für Tumorzellen (Thong et al. 2007). In einer weiteren Arbeiten wurden an 20 unterschiedlichen Stellen der Mundhöhle bei 8 Patienten mit auffälligen Schleimhautläsionen eine ungeordnete Oberflächenstruktur und irreguläre Reflexmuster als Karzinomkriterium beschrieben (Maitland et al. 2008). Die beiden bis dahin größten Studien an 12 und dann an 15 Patienten in-vivo mit CLE und Fluorescein und teilweise ex-vivo mit topischer Applikation von Acriflavin befanden ein unregelmäßiges Zellenmuster, eine Variabilität in der Zellengröße und ein Kontrastmittelaustritt in das umliegende Gewebe als charakteristische Merkmale für KHT (Haxel et al. 2010, Pogorzelski et al. 2012). In einer aktuellen Studie wurden gezielt in-vivo und ex-vivo CLE-Aufnahmen der Tumorgrenzregion von 135 KHT an einer Klinik durchgeführt. Den Autoren ging es darum, inwieweit die CLE als non-invasive „optische Biopsie“ intraoperativ helfen kann den Tumor von seiner gesunden Umgebung abzugrenzen. Das Bildmaterial wurde von erfahrenen

Pathologen, ungeübten Chirurgen und vollständigen medizinischen Laien ausgewertet. In einer initialen Trainingsphase wurden anhand von Sequenzen mit Beispielbildern und dem zugehörigen H&E-gefärbten Schnittpräparaten die Unterschiede zwischen verhornenden und unverhornenden Karzinomen sowie von gesunder Schleimhaut erlernt. Unmittelbar im Anschluss wurden die Karzinomgrenzen mittels CLE an einem in Formalin fixierten Tumorpräparat von den Pathologen zu 97%, den ungeübten Chirurgen zu 85% und den Laien zu 70% korrekt bestimmt. In der Arbeit fehlen jedoch genauere Angaben oder eine Übersicht über die im Training erlernten Kriterien, die in die Entscheidung mit einfließen. Ein gewisser Grad an Keratinisierung der Oberfläche ist als einzigstes Merkmal an dieser Stelle genannt worden (Linxweiler et al. 2016). Die bisher aufgeführten Studien präsentieren keine Daten über eine Interobserver- oder Intraobserver-Realibilität bezüglich der für die Klassifizierung zu Grunde liegenden Kriterien. Eine weitere aktuelle Studie beschäftigte sich mit der Entwicklung und Validierung eines Klassifikations- und Scoring-Systems zur Diagnose von oralen Plattenepithelkarzinomen mittels CLE und bezieht erstmals auch eine Interobserver- und Intraobserver-Realibilität in die Ergebnisse der Bildauswertung mit ein. In der Arbeit wurden CLE-Aufnahmen initial von 3 CLE-erfahrenen Experten ausgewertet und mit H&E-Schnittpräparaten verglichen. Dabei wurden eine unorganisierte Gewebearchitektur, ein fehlender interzellulärer Spalt, sowie in Form, Farbe und Größe unregelmäßige Zellen als Malignitätskriterien definiert. Ebenso wurden als schwarze Flecken bezeichnete Zellcluster und der sich als intensiver leuchtende, verschwommen und wolkig darstellende Austritt von Fluorescein durch die Zellwände der Tumorzellen als Unterscheidungskriterien festgelegt. Zusätzlich wurden auch irreguläre Gefäße oder Gefäßverläufe von den Autoren beobachtet und als weiteres Tumorkriterium postuliert. Nach erfolgter Auswertung der CLE-Aufnahmen von 50 KHT und 45 Vergleichsaufnahmen von gesunder Schleimhaut und sorfältiger Wichtung der Unterscheidungskriterien wurde in der Studie durch die CLE-Experten ein Klassifikations- und Scoring-System vorgeschlagen. Nach einer Reevaluation nach 4 Wochen wird eine Inter-Rater Reliabilität von 0.73 für CLE-Experten und 0.814 für Nicht-CLE-Experten, sowie eine Intra-Rater Reliabilität von 0.989 für CLE-Experten und 0.884 für Nicht-CLE-Experten angegeben (Oetter et al. 2016). Auch diese Studie zeigt, dass sich CLE-Bilder von KHT möglicherweise anhand

der Gewebearchitektur, der Zellmorphologie und auch durch ein Leaking von Fluorescein von CLE-Bildern von gesunder Schleimhaut unterscheiden lassen. Um die erarbeiteten Unterscheidungskriterien zu validieren, verzichteten die Autoren jedoch auf eine exakte Datenerhebung anhand messbarer Bildinformationen. Weitere Arbeiten in diesem Zusammenhang wurden bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung der vorgelegten Arbeit nach unserem Wissen nicht publiziert.

Die Auswertung von CLE-Bildern in den bisher zitierten Studien erfolgte stets untersucherabhängig. Entscheidende Faktoren für die Einschätzung der Bildinformationen waren Erfahrung und Fachwissen. Auch die Entwicklung eines allgemein zugänglichen Scoring-System für Nicht-Experten würde zu untersucherabhängigen Ergebnissen führen, auch wenn es mit einer hohen Sensitivität und Spezifität helfen kann, CLE-Bilder einzuschätzen. Dem Chirurgen muss dabei aber bewusst sein, dass optische Bildgebungsverfahren aus komplizierten Prozessen bestehen. Er sollte daher die Grundlagen der Technik und eventuelle Störfaktoren und Limitationen kennen, um das intraoperativ dargebotene Fluoreszenzbild des Tumors adäquat interpretieren zu können (Keereweer et al. 2013). Der Chirurg ist in der Regel aber nicht wie der Pathologe trainiert, die histologischen Schnittpräparaten ähnelnden, „in-vivo“ entstehenden CLE-Bilder zu interpretieren. (Paull et al. 2011). Um den Nutzen der CLE zu verbessern sind daher objektive Unterscheidungskriterien zwingend notwendig. Die vorgelegte Publikation ist in diesem Zusammenhang unseres Wissens die weltweit erste Studie, die quantitativ messbare Daten für eine objektive Entscheidungsgrundlage aus CLE-Bildern im OADT erhebt. Anhand der Ergebnisse wurde der Beweis erbracht, dass die Architektur der Zellverbände und die Zellgröße mit der verwendeten Methode definitive Unterscheidungskriterien zwischen KHT und gesunder Schleimhaut sind. Durch die Studie wurden darüber hinaus zahlreiche statistische Informationen über die Zellgrößen und Gewebestrukturen von KHT und gesunder Schleimhaut des OADT gesammelt.

4.2 Automatisierte Bildanalyse

Die vorgelegte Arbeit zeigt, dass eine automatisierte Analyse von CLE-Bildern des OADT mit der eigens entwickelten Methode möglich ist. Aufgrund der Annahme, dass Unterschiede in der Zellgröße eine entscheidende Rolle spielen, war der Grundgedanke der Methode zunächst die automatische Analyse der statistischen epithelialen Zellgrößen. Hierfür war die Bestimmung der Zellgrenzen erforderlich. Dafür eignete sich die bereits mehrfach in anderen Arbeiten erfolgreich angewandte automatische Segmentation, die den Interzellularraum und somit auch die Zellwände netzartig darstellt. Die Bestimmung der Zellgrößen erfolgte dann mittels Histogrammen, die wie Abstandskarten die Entfernung der Zellwände zu den Zellmittelpunkten auf Pixel genau berechnet. Diese Histogramme wurden dann als „feature vectors“, im Sinne von spezifischen Merkmalen, für einen maschinellen, automatisierten Lernprozess zur Unterscheidung zwischen CLE-Bildern von KHT und CLE-Bildern von gesunder Schleimhaut verwendet. Jeweils ein Tumorpatient und ein Patient mit gesunder Schleimhaut wurden mit der „leave 2 patients out“-Methode vom Training ausgespart, um den Bilderkennungsalgorithmus anschließend in einer Testphase zu überprüfen. Die gewählte Methode erreicht im Mittel eine Spezifität von 85%, eine Sensivität von 72% und einen Grad der Übereinstimmung von 74%. Ein erfahrener Kopf-Halschirurg erreichte bei der Auswertung der 12 Patienten in dieser Studie eine Sensivität von 91,6% bei einer Fehldiagnose. Eine vergleichbare Arbeit wurde bis zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Studien nach unserem Wissen nicht publiziert. Die aus dem Kopf-Halsbereich gewonnenen Daten können daher nur mit Arbeiten aus anderen Fachgebieten verglichen werden.

Auf dem Gebiet der Gastroenterologie wurde eine Software zur automatisierten Klassifikation von Colorectalpolypen entwickelt, mit der ähnliche Werte für den Grad der Übereinstimmung (89,6%), die Sensivität (92,5%) und die Spezifität (83,3%) erreicht werden. Auch hier war ein erfahrener Endoskopiker mit einer Sensitivität von 97,1% - 98,6%, einer Spezifität von 96,9% bis 99,0% und einem Grad der Übereinstimmung von ca. 97,6% - 98,2% geringfügig besser als der Algorithmus (Andre et al. 2012).

Für die Fragestellung der Erkennung von KHT kann man die Ergebnisse der vorgelegten Studie mit den Ergebnissen anderer optischer Techniken vergleichen.

Bei der Auswertung von endoskopischen Bildern mit Autofluoreszenz erreicht beispielsweise ein erfahrener Chirurg eine bessere Sensitivität (91% vs. 73%), Spezifität (84% vs. 79%) und einen besseren Grad der Übereinstimmung (88% vs. 77%) als mit der Untersuchung mit Weißlicht (Kraft et al. 2011). Für die optische Kohärenztomographie ist bezüglich der Unterscheidung von KHT von gesunder Schleimhaut im OADT eine Sensitivität von 77,8% - 100% und Spezifität von 70,3% auf 75,8% beschrieben (Volgger et al. 2013b). Kein im OADT aktuell zur Tumorerkennung angewandtes optische Bildgebungsverfahren verwendet einen vergleichbaren methodischen Ansatz. Bezüglich der Diskussion des technisch-mathematischen Ansatzes der Methodik wird auf die Originalarbeit verwiesen.

Eine weiterer wesentlicher Fortschritt, den die Verwendung eines automatisierten Algorithmus mit sich bringt, ist die Tatsache, dass der Algorithmus auch nach Abschluss dieser Arbeit für zukünftige Studien zur Verfügung steht und seine Lernfähigkeit unbegrenzt ist. Damit besteht permanent die Möglichkeiten, den Algorithmus weiterhin zu trainieren und darauf aufbauend weiter zu entwickeln. Im Vergleich zu den anderen vorgestellten optischen Techniken, für die aktuell solche Algorithmen noch nicht vorliegen, scheint es so, als ob man hier einer online- und offline-Differenzierung von KHT ein Stück weit näher gekommen ist.

4.3 Limitierungen

Eine wesentliche Einschränkung der hier vorgestellten automatisierten Bildanalysemethode besteht darin, dass sie ausschließlich zur Erkennung von manifesten KHT entwickelt wurde. Bilder von histologisch gesicherten Epitheldysplasien oder -hyperplasien wurden nicht in den Datensatz für die Entwicklung und das Training des Erkennungsalgorithmus einbezogen. Daher ist eine Differenzierung von Tumorstadien mit diesem Algorithmus noch nicht möglich. Eine weitere wesentliche Einschränkung ergibt sich in diesem Zusammenhang aus der geringen Eindringtiefe der Methode, die eine Differenzierung zwischen hochgradigen epithelialen Dysplasien und mikroinvasiven Plattenepithelkarzinomen ebenfalls nicht ermöglicht. Die stromale Invasion eines Plattenepithelkarzinoms ist ein allgemein festgelegtes Differenzierungskriterium, und kann mit der in der Arbeit verwendeten Methode nicht beurteilt werden (Betz et al. 2016).

Jede neue Methode birgt Gefahren die sich beispielsweise aus der methodenspezifischen Abhängigkeit des Verfahrens von der intravenösen Applikation des Kontrastmittels Fluorescein ergeben. Bei Patienten mit Herz-Kreislaufkrankungen, Diabetes mellitus sowie multipler medikamentöser Begleittherapien bestehen hinsichtlich Fluorescein laut Herstellerangaben Anwendungsbeschränkungen. Insbesondere ist ein Natriumgehalt bis zu 3,15 Millimol (mmol), die 72,45 Milligramm (mg) entsprechen, pro Einzeldosis zu beachten. Eine Applikation kann bei Patienten unter Natrium-kontrollierter Diät ernsthafte Unverträglichkeitsreaktionen hervorrufen. Vor der Anwendung von Fluorescein bei einer Angiographie muss der Patient beispielsweise ausführlich zu kardiopulmonalen Vorerkrankungen, Allergien oder β -Blockern einschließlich β -blockerhaltigen Augentropfen befragt werden, da eine gleichzeitige Gabe in seltenen Fällen schwere anaphylaktische Reaktionen hervorruft. Betablocker können dann die vaskuläre Kompensationsreaktion bei einem anaphylaktischem Schock reduzieren und darüberhinaus die Wirksamkeit von Adrenalin im Falle einer Reanimation herabsetzen. Ebenso ist die gleichzeitige i. v. Injektion von Fluorescein mit anderen Arzneimitteln aufgrund möglicher Wechselwirkungen zu vermeiden. Eine Untersuchung mit Fluorescein i. v. bei bestehender Dauertherapie mit β -Blockern bzw. bei bekannten Überempfindlichkeitsreaktionen darf laut Hersteller nur unter Aufsicht eines intensivmedizinisch erfahrenen Arztes erfolgen und der Nutzen ist gegenüber dem Risiko einer schwereren Überempfindlichkeitsreaktion, die in manchen Fällen tödlich endete, sorgfältig abzuwägen (Novartis 2017). Dem gegenüber ist jedoch anzufügen, dass sich die bisherige intravenöse Anwendung in der Medizin als nahezu problemlos erwies (Wallace et al. 2010).

4.4 Quo vadis automatisierter Bilderkennungsalgorithmus ?

Eine „optische Biopsie“ soll als objektives Hilfsmittel und für eine spezifische Fragestellung entwickelt, zusätzlich zum individuellen Wissensstand, einem medizinischen Experten bei seiner Entscheidungsfindung in der Weise unterstützen, dass sein Behandlungsergebnis, wie etwa das Erkennen von KHT, eindeutig verbessert wird. Auch wenn in einer aktuellen Arbeit geübte Chirurgen im Vergleich zu medizinischen Laien Bilddaten mit höherer Erkennungsrate auswerten und auch wenn sich mit speziellen, merkmalsorientierten Trainingsbildsequenzen die Erkennungsrate von unbekannten Bildern noch steigern lässt, so bleibt diese Methode stets subjektiv und vom Untersucher abhängig (Oetter et al. 2016). Automatisierungsprozesse in der Bildverarbeitung moderner optischer Untersuchungstechniken schaffen im Gegensatz dazu einen Standard, der eine objektive Auswertung der Daten zulässt. Zum einen lässt sich dies bei der CLE durch die definierte Eindringtiefe und zum anderen durch die definierte Größe des Bildausschnittes erreichen. Der Algorithmus ist zudem so trainiert, dass er nur die Bildinformationen verwendet, die er zweifelsfrei erkennt, wodurch kein interpretatorischer Handlungsspielraum entsteht. Dadurch wird eine Transparenz in der Entscheidungsfindung erreicht, die unabhängig vom individuellen Ausbildungsstand, der Erfahrung und dem Absolvieren von Trainingseinheiten ist. Ein Nachteil der verwendeten Methode ist jedoch, dass nur die oberflächlichen Epithelschichten in einem vergleichsweise kleinen Untersuchungsbereich analysiert werden. Hieraus ergeben sich Ansätze für Verbesserungen der CLE. Mit zusätzlichen Informationen aus tieferen Gewebeschichten und einem größeren Untersuchungsbereich könnte die Genauigkeit der Methode verbessert werden (Keereweer et al. 2013).

Perspektivisch werden bei der Weiterentwicklung der CLE große Fortschritte in der in vivo Darstellung auf molekularer Ebene erwartet. Beispielsweise können bereits Kolorektalkarzinome mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörper gegen im Karzinom vermehrt exprimierte epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) mikroskopisch während Endoskopien visualisiert werden. Damit kann diese Technik vielleicht zukünftig für gezieltere Therapien und für das Therapiemonitoring eingesetzt werden (Liu et al. 2013). Ein Thema welches in Zukunft definitiv in der Medizin eine Rolle spielen wird. Ebenso kann eine Kombination der CLE mit anderen optischen Bildgebungsverfahren zu einer

weiteren Verbesserung der Genauigkeit führen (Thong et al. 2012). Auch hieraus ergibt sich hinsichtlich zunehmender Neuentwicklungen im Bereich optischer Techniken und den rasant steigenden Möglichkeiten in der digitalen Bildverarbeitung ein weites Forschungsfeld mit zunehmenden Interesse (Volgger et al. 2017).

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist die Entwicklung einer Methode, die wie eine „optische Biopsie“ im Operationssaal angewendet werden kann. Die angeführten Limitierungen und Möglichkeiten zeigen auf, dass der Algorithmus hierfür erst weiterentwickelt werden muss. Der nächste Schritt muss daher die Validierung des Algorithmus in größeren Studien sein.

5. Schlussfolgerungen

Eine „optische Biopsie“ soll bei der Erkennung und Abgrenzung von KHT die klassische Methode mit Weißlichtuntersuchung und histologischer Gewebeaufarbeitung durch den Pathologen aktuell nicht ersetzen, sondern den Untersucher als Hilfsmittel bei der Diagnostik unterstützen. Die in der Arbeit entwickelte Kombination aus einem automatisierten Bilderkennungsalgorithmus mit der CLE scheint hierfür das Potential zu haben. Weiterhin erlaubt der in der vorgelegten Arbeit entwickelte Bilderkennungsalgorithmus ex vivo verlässliche und objektive Ergebnisse bei der Erkennung von CLE-Bildern von KHT.

Durch eine Weiterentwicklung des Algorithmus erscheint die Etablierung der CLE als intraoperatives chirurgisches Hilfsmittel bei der Diagnostik und Therapie von KHT im klinischen Alltag machbar.

6. Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abbaci M, Breuskin I, Casiraghi O, De Leeuw F, Ferchiou M, Temam S, Laplace-Builhe C. 2014. Confocal laser endomicroscopy for non-invasive head and neck cancer imaging: a comprehensive review. *Oral Oncol*, 50 (8):711-716.
- Ambrosch P. 1996. Screeninguntersuchungen zur Früherkennung von Karzinomen der oberen Luft- und Speisewege. *HNO*, 44 (11):609-611.
- Anderson CR, Sisson K, Moncrieff M. 2015. A meta-analysis of margin size and local recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 51 (5):464-469.
- Andre B, Vercauteren T, Buchner AM, Krishna M, Ayache N, Wallace MB. 2012. Software for automated classification of probe-based confocal laser endomicroscopy videos of colorectal polyps. *World J Gastroenterol*, 18 (39):5560-5569.
- Arens C, Glanz H, Voigt-Zimmermann S. 2015. [Vascular Lesions of Vocal Folds - Part 2: Perpendicular Vascular Lesions]. *Laryngorhinootologie*, 94 (11):738-744.
- Arens C, Betz C, Kraft M, Voigt-Zimmermann S. 2016. [Narrow band imaging for early diagnosis of epithelial dysplasias and microinvasive tumors in the upper aerodigestive tract]. *HNO*, 64 (1):19-26.
- Betz CS, Kraft M, Arens C, Schuster M, Pfeffer C, Ruhm A, Stepp H, Englhard A, Volgger V. 2016. [Optical diagnostic methods for early tumour diagnosis in the upper aerodigestive tract: Quo vadis?]. *HNO*, 64 (1):41-48.
- Brocklehurst P, Kujan O, O'Malley LA, Ogden G, Shepherd S, Glenny AM. 2013. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev*, (11):CD004150.
- Burger W, Burge MJ. 2015. Digitale Bilder. In: Burger W., Burge M., Hrsg. *Digitale Bildverarbeitung*. X.media.press. Dritte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 1-24.
- Burzynski NJ, Firriolo FJ, Butters JM, Sorrell CL. 1997. Evaluation of oral cancer screening. *J Cancer Educ*, 12 (2):95-99.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward W, Prasher D. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263 (5148):802-805.
- Chauhan SS, Abu Dayyeh BK, Bhat YM, Gottlieb KT, Hwang JH, Komanduri S, Konda V, Lo SK, Manfredi MA, Maple JT, Murad FM, Siddiqui UD, Banerjee S, Wallace MB. Confocal laser endomicroscopy. *Gastrointestinal Endoscopy*, 80 (6):928-938.
- Christlein V. et al. 2017. Tutorial: Deep Learning Advancing the State-of-the-Art in Medical Image Analysis. In: Maier-Hein, geb. Fritzsche K., Deserno, geb. Lehmann T., Handels H., Tolxdorff T., Hrsg. *Bildverarbeitung für die Medizin 2017*. Informatik aktuell. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- De Veld DC, Witjes MJ, Sterenborg HJ, Roodenburg JL. 2005. The status of in vivo autofluorescence spectroscopy and imaging for oral oncology. *Oral Oncol*, 41 (2):117-131.
- de Veld DC, Skurichina M, Witjes MJ, Duin RP, Sterenborg HJ, Roodenburg JL. 2004. Clinical study for classification of benign, dysplastic, and malignant oral lesions using autofluorescence spectroscopy. *J Biomed Opt*, 9 (5):940-950.

- Deserno TM. 2011. Medizinische Bildverarbeitung. In: Kramme R, Hrsg. Medizintechnik: Verfahren – Systeme – Informationsverarbeitung. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 825-846.
- Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. 2001. Head and neck cancer. *N Engl J Med*, 345 (26):1890-1900.
- Ganga RS, Gundre D, Bansal S, Shirsat PM, Prasad P, Desai RS. 2017. Evaluation of the diagnostic efficacy and spectrum of autofluorescence of benign, dysplastic and malignant lesions of the oral cavity using VELscope. *Oral Oncology*, 75:67-74.
- Goetz M, Watson A, Kiesslich R. 2011. Confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal diseases. *J Biophotonics*, 4 (7-8):498-508.
- Haddad RI, Shin DM. 2008. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med*, 359 (11):1143-1154.
- Haxel BR, Goetz M, Kiesslich R, Gosepath J. 2010. Confocal endomicroscopy: a novel application for imaging of oral and oropharyngeal mucosa in human. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 267 (3):443-448.
- Huang TT, Huang JS, Wang YY, Chen KC, Wong TY, Chen YC, Wu CW, Chan LP, Lin YC, Kao YH, Nioka S, Yuan SF, Chung PC. 2017. Novel quantitative analysis of autofluorescence images for oral cancer screening. *Oral Oncol*, 68:20-26.
- Keereweer S, Van Driel PB, Snoeks TJ, Kerrebijn JD, Baatenburg de Jong RJ, Vahrmeijer AL, Sterenborg HJ, Lowik CW. 2013. Optical image-guided cancer surgery: challenges and limitations. *Clin Cancer Res*, 19 (14):3745-3754.
- Kraft M, Betz CS, Leunig A, Arens C. 2011. Value of fluorescence endoscopy for the early diagnosis of laryngeal cancer and its precursor lesions. *Head Neck*, 33 (7):941-948.
- Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. 2011. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 11 (1):9-22.
- Lingen MW, Kalmar JR, Karrison T, Speight PM. 2008. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. *Oral Oncol*, 44 (1):10-22.
- Linxweiler M, Kadah BA, Bozzato A, Bozzato V, Hasenfus A, Kim YJ, Wagner M, Igressa A, Schick B, Charalampaki P. 2016. Noninvasive histological imaging of head and neck squamous cell carcinomas using confocal laser endomicroscopy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 273 (12):4473-4483.
- Liu J, Zuo X, Li C, Yu T, Gu X, Zhou C, Li Z, Goetz M, Kiesslich R, Li Y. 2013. In vivo molecular imaging of epidermal growth factor receptor in patients with colorectal neoplasia using confocal laser endomicroscopy. *Cancer Lett*, 330 (2):200-207.
- Maitland KC, Gillenwater AM, Williams MD, El-Naggar AK, Descour MR, Richards-Kortum RR. 2008. In vivo imaging of oral neoplasia using a miniaturized fiber optic confocal reflectance microscope. *Oral Oncol*, 44 (11):1059-1066.
- Minsky M. 1988. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning*, 10 (4):128-138.
- Muto M, Nakane M, Katada C, Sano Y, Ohtsu A, Esumi H, Ebihara S, Yoshida S. 2004. Squamous cell carcinoma in situ at oropharyngeal and hypopharyngeal mucosal sites. *Cancer*, 101 (6):1375-1381.
- Muto M, Minashi K, Yano T, Saito Y, Oda I, Nonaka S, Omori T, Sugiura H, Goda K, Kaise M, Inoue H, Ishikawa H, Ochiai A, Shimoda T, Watanabe H, Tajiri H, Saito D. 2010. Early detection of superficial squamous cell

- carcinoma in the head and neck region and esophagus by narrow band imaging: a multicenter randomized controlled trial. *J Clin Oncol*, 28 (9):1566-1572.
- Ni XG, He S, Xu ZG, Gao L, Lu N, Yuan Z, Lai SQ, Zhang YM, Yi JL, Wang XL, Zhang L, Li XY, Wang GQ. 2011. Endoscopic diagnosis of laryngeal cancer and precancerous lesions by narrow band imaging. *J Laryngol Otol*, 125 (3):288-296.
- Novartis 19.03.2018. Fachinformation Fluorescein Alcon® 10% Injektionslösung. Novartis Pharma GmbH, 90327 Nürnberg. Zulassungsnummer: 6375757.00.00 <https://www.novartis.de/product-list-patient>.
- Oetter N, Knipfer C, Rohde M, von Wilmowsky C, Maier A, Brunner K, Adler W, Neukam FW, Neumann H, Stelzle F. 2016. Development and validation of a classification and scoring system for the diagnosis of oral squamous cell carcinomas through confocal laser endomicroscopy. *J Transl Med*, 14 (1):159.
- Onizawa K, Saginoya H, Furuya Y, Yoshida H. 1996. Fluorescence photography as a diagnostic method for oral cancer. *Cancer Lett*, 108 (1):61-66.
- Paull PE, Hyatt BJ, Wassef W, Fischer AH. 2011. Confocal laser endomicroscopy: a primer for pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, 135 (10):1343-1348.
- Petráň M, Hadravský M, Egger MD, Galambos R. 1968. Tandem-Scanning Reflected-Light Microscope. *Journal of the Optical Society of America*, 58 (5):661-664.
- Pogorzelski B, Hanenkamp U, Goetz M, Kiesslich R, Gosepath J. 2012. Systematic intraoperative application of confocal endomicroscopy for early detection and resection of squamous cell carcinoma of the head and neck: a preliminary report. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 138 (4):404-411.
- Poh CF, Zhang L, Anderson DW, Durham JS, Williams PM, Priddy RW, Berean KW, Ng S, Tseng OL, MacAulay C, Rosin MP. 2006. Fluorescence visualization detection of field alterations in tumor margins of oral cancer patients. *Clin Cancer Res*, 12 (22):6716-6722.
- Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ. 1992. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111 (2):229-233.
- Rothenberg SM, Ellisen LW. 2012. The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Clinical Investigation*, 122 (6):1951-1957.
- Sheppard C, Shotton D. 1997. Confocal laser scanning microscopy. BIOS Scientific Oxford.
- Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*, 59 (3):223-239.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. 1953. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*, 6 (5):963-968.
- Thong PS, Olivo M, Kho KW, Zheng W, Mancor K, Harris M, Soo KC. 2007. Laser confocal endomicroscopy as a novel technique for fluorescence diagnostic imaging of the oral cavity. *J Biomed Opt*, 12 (1):014007.

- Thong PS, Tandjung SS, Movania MM, Chiew WM, Olivo M, Bhuvaneswari R, Seah HS, Lin F, Qian K, Soo KC. 2012. Toward real-time virtual biopsy of oral lesions using confocal laser endomicroscopy interfaced with embedded computing. *J Biomed Opt*, 17 (5):056009.
- Tirelli G, Piovesana M, Gatto A, Torelli L, Nata FB. 2016. Is NBI-Guided Resection a Breakthrough for Achieving Adequate Resection Margins in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma? *Annals of Otology, Rhinology & Laryngology*, 125 (7):596-601.
- Volgger V, Conderman C, Betz CS. 2013a. Confocal laser endomicroscopy in head and neck cancer: steps forward? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 21 (2):164-170.
- Volgger V, Felicio A, Lohscheller J, Englhard AS, Al-Muzaini H, Betz CS, Schuster ME. 2017. Evaluation of the combined use of narrow band imaging and high-speed imaging to discriminate laryngeal lesions. *Lasers Surg Med*, 49 (6):609-618.
- Volgger V, Stepp H, Ihrler S, Kraft M, Leunig A, Patel PM, Susarla M, Jackson K, Betz CS. 2013b. Evaluation of optical coherence tomography to discriminate lesions of the upper aerodigestive tract. *Head Neck*, 35 (11):1558-1566.
- Wallace MB, Meining A, Canto MI, Fockens P, Miehke S, Roesch T, Lightdale CJ, Pohl H, Carr-Locke D, Lohr M, Coron E, Filoche B, Giovannini M, Moreau J, Schmidt C, Kiesslich R. 2010. The safety of intravenous fluorescein for confocal laser endomicroscopy in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther*, 31 (5):548-552.
- Wang TD, Van Dam J. 2004. Optical biopsy: a new frontier in endoscopic detection and diagnosis. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2 (9):744-753.
- Watanabe A, Taniguchi M, Tsujie H, Hosokawa M, Fujita M, Sasaki S. 2008. The value of narrow band imaging endoscope for early head and neck cancers. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 138 (4):446-451.
- Weijers M, Snow GB, Bezemer DP, van der Wal JE, van der Waal I. 2004. The status of the deep surgical margins in tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma and risk of local recurrence; an analysis of 68 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33 (2):146-149.
- Zheng W, Harris M, Kho KW, Thong PS, Hibbs A, Olivo M, Soo KC. 2004. Confocal endomicroscopic imaging of normal and neoplastic human tongue tissue using ALA-induced-PPIX fluorescence: a preliminary study. *Oncol Rep*, 12 (2):397-401.

7. Anhang

7.1 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Univ.-Prof. Dr. med. Orlando Guntinas-Lichius, Dr. rer. nat. Erik Rodner, Dr. rer. nat. Wolfgang Ortmann, Dr. med. Joachim Stadler, PD Dr. med. habil. Carsten Schmidt, Prof. Dr. med. Iver Petersen, Univ.-Prof. Dr. med. Andreas Stallmach, Univ.-Prof. Dr.-Ing. Joachim Denzler, PD Dr. med. habil. Gerd Fabian Volk,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum,

Unterschrift des Verfasser

7.2 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Andreas Peter Dittberner
Geboren am: 19. Oktober 1980 in Burglengenfeld
Adresse: Helene-Holzmanstr. 11, 07745 Jena
Tel.: 00 49 (0) 179 900 59 26
E-Mail: andy.dittberner@googlemail.com

Studium

10/2005-11/2012 Universität Regensburg
Studium der Humanmedizin

10/2001-09/2002 Universität Ulm
Studium der Chemie

Werdegang

05/2013-06/2014 Universitätsklinikum Jena
Weiterbildung zum Facharzt der Hals-Nasen-
Ohrenheilkunde

07/2014-09/2016 Universitätsklinikum Erlangen
Weiterbildung zum Facharzt der Hals-Nasen-
Ohrenheilkunde

seit 10/2016 Universitätsklinikum Jena
Weiterbildung zum Facharzt der Hals-Nasen-
Ohrenheilkunde

Publikationen

04/2016 **Dittberner A**, Rodner E, Ortmann W, Stadler J, Schmidt C, Petersen I, Stallmach A, Denzler J, Guntinas-Lichius O. 2016. Automated analysis of confocal laser endomicroscopy images to detect head and neck cancer. Head Neck, 38 Suppl 1:E1419-1426.

02/2017 Schmidt F, **Dittberner A**, Koscielny S, Petersen I, Guntinas-Lichius O. 2017. Feasibility of real-time near-infrared indocyanine green fluorescence endoscopy for the evaluation of mucosal head and neck lesions. Head Neck, 39 (2):234-240.

- 09/2017 Goncalves M, Iro H, **Dittberner A**, Agaimy A, Bohr C. 2017. Value of confocal laser endomicroscopy in the diagnosis of vocal cord lesions. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 21 (18):3990-3997.
- 05/2016 **Dittberner A**, Jaremenko Ch, Goncalves M, Bohr Ch, Maier A, Iro H: Automatisierte Bewertung von auf konfokaler Laserendomikroskopie (CLE) basierten Bildern des Stimmlippenepithels mittels Mustererkennung. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 87. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Düsseldorf, 04.05. - 07.05.2016.
- 05/2017 **Dittberner A**, Schmidt F, Priese J, Rödiger H, Koscielny S, Petersen I, Guntinas-Lichius O: Machbarkeitsstudie zur Real-Time Nah-Infrarot Indocyaningrün-Fluoreszenz-Endoskopie (NIR-ICG-FE) zur Beurteilung von Schleimhautläsionen im Kopf-Halsbereich. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 88. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Erfurt, 24.05. - 27.05.2017.
- 05/2018 **Dittberner A**, Sickert S, Bitter T, Koscielny S, Denzler J, Guntinas-Lichius O. Entwicklung eines automatischen Bilderkennungsverfahrens durch „Deep Learning“ zur Detektion von Kopf-Hals-Karzinomen (PEC) anhand standardisierter Real-Time Nah-Infrarot ICG-Fluoreszenz-Endoskopie-Bilder (NIR-ICG-FE). Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 89. Jahres-versammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Lübeck, 09.05 – 12.05.2018.
- 05/2016 Scherl C, Ogadzanova A, Agaimy A, Goncalves M, **Dittberner A**, Iro H, Alexiou Ch: Erste Erfahrungen mit dem NBI-System an der HNO-Klinik Erlangen. Deutsche Gesellschaft für Hals-Nasen Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. 87. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Düsseldorf, 04.05. - 07.05.2016.

7.3 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt zu allererst Prof. Dr. Guntinas-Lichius, der mich seit vielen Jahren unnachgiebig unterstützt und für meine persönliche und berufliche Entwicklung Sorge trägt.

Mein ganz besonderer inniger Dank gilt meiner geliebten Frau Tina. Sie ist meine Motivation und mit Ihrer liebevollen Ruhe und Kraft treibt sich mich stetig voran.

Mein herzlichster Dank gilt darüber hinaus meinem tollen Kollegium des HNO-Klinikums Jena, allen voran den Oberärztinnen und Oberärzten, welche mir immer, wenn es nötig ist, Mut zusprechen und mir den entscheidenden Rückhalt geben.

Ich danke meinen Eltern Angela und Claus dafür, dass sie mich gelehrt haben, an mich zu glauben und meine Ziele niemals aufzugeben. Mein ergebenster Dank gilt meinen Geschwistern Janine und Alexander und meinem lieben Stiefvater Steve, deren Unterstützung mir sehr viel bedeutet.